



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIANA SILVEIRA RUAS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MÁXIMA DA CADEIA TRANSPORTADORA DE  
ELÉTRONS MITOCONDRIAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

***EVALUATION OF THE MAXIMUM CAPACITY OF THE MITOCHONDRIAL  
ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN TUMOR CELL LINES***

CAMPINAS

2019

**JULIANA SILVEIRA RUAS**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MÁXIMA DA CADEIA TRANSPORTADORA DE  
ELÉTRONS MITOCONDRIAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**

***EVALUATION OF THE MAXIMUM CAPACITY OF THE MITOCHONDRIAL  
ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN TUMOR CELL LINES***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

*Doctorate Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requisites required to obtain a PhD in Sciences.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
JULIANA SILVEIRA RUAS E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO.

CAMPINAS

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2011/50400-0; FAPESP, 2017/17728-8; CAPES

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R821a Ruas, Juliana Silveira, 1989-  
Avaliação da capacidade máxima da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em linhagens de células tumorais / Juliana Silveira Ruas. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Roger Frigério Castilho.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trifosfato de adenosina. 2. Consumo de oxigênio. 3. Glicólise. 4. Glioblastoma. 5. Mitocôndrias. I. Castilho, Roger Frigério, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the maximum capacity of the mitochondrial electron transport chain in tumor cell lines

**Palavras-chave em inglês:**

Adenosine triphosphate

Oxygen consumption

Glycolysis

Glioblastoma

Mitochondria

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Roger Frigério Castilho [Orientador]

Sérgio Akira Uyemura

Tiago Rodrigues

Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos Santos

Rosana Almada Bassani

**Data de defesa:** 19-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**JULIANA SILVEIRA RUAS**

---

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO**

---

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO**
  - 2. PROF. DR. SÉRGIO AKIRA UYEMURA**
  - 3. PROF. DR. TIAGO RODRIGUES**
  - 4. PROF. DR. GUILHERME RODRIGO REIS MONTEIRO DOS SANTOS**
  - 5. PROFA. DRA. ROSANA ALMADA BASSANI**
- 

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

---

**Data da defesa: 19/02/2019**

---

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre direcionar meus passos e atender minhas preces.  
Fonte da minha fé e força.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pela oportunidade de desenvolver um estudo científico sob sua valiosa orientação. Por todos seus ensinamentos, discussões científicas e conversas.

À todos os professores que passaram pelo meu caminho e agregaram conhecimento e motivação, em especial ao Dr. Aníbal Vercesi e Dra. Helena Oliveira.

Aos funcionários e aos alunos do laboratório de Bioenergética e de Neurodegeneração Experimental pelas contribuições de desenvolvimento pessoal e científico: Márcia Fagian, Edilene Santos, Roberto Stahl, Claudia Navarro, Erika Rodrigues, Estela Busanello, Annelise Francisco, Marina Sartori, Ana Carolina Marques, Juliana Ronchi, Tiago Figueira, Mayara Bertolini, Noelia Lander, Miguel Chiurillo, Gabriel Dorighello, Guilherme Reis, Raquel Negreiros.

Aos auxílios concedidos pela instituição “Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior” – CAPES.

Aos auxílios concedidos pela instituição “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” – CNPq.

Aos auxílios concedidos pela instituição “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” – FAPESP, números de processos: 2011/50400-0 e 2017/17728-8.

À minha família por todo o amor, amparo e incentivo, principalmente ao meu pai Luiz Roberto Ruas, mãe Aparecida P. da Silveira Ruas e irmã Roberta Silveira Ruas que vibram a cada conquista realizada.

Ao Thomas Villegas Samara que sempre esteve ao meu lado, me motivando e apoiando em todos os momentos, ajudando nas fases mais difíceis e a todo seu cuidado e dedicação a mim. Da mesma forma à Sônia Samara e cunhados.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

**Carl Sagan**

## RESUMO

A capacidade do sistema transportador de elétrons mitocondrial em células intactas é estimada pela taxa máxima de consumo de oxigênio ( $\text{OCR}_{\text{max}}$ ) induzida por protonóforos. Esta estimativa geralmente é precedida pelo uso de inibidores da ATP sintase. O presente trabalho objetivou reportar e elucidar o mecanismo pelo qual inibidores da ATP sintase causam subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e, conseqüentemente, da capacidade de reserva respiratória (SRC, diferença entre o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e basal). Ainda, objetivou-se o estabelecimento de um protocolo experimental que permitisse a estimativa do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  na presença de inibidores da ATP sintase. Os experimentos foram realizados com linhagens de células, sendo a maior parte deles com células originárias de glioblastoma humano (T98G e U-87MG). O consumo de oxigênio por células em suspensão foi estimado em oxígrafo de alta resolução equipado com eletrodo de Clark, enquanto para células aderidas utilizou-se um sistema automatizado de leitura de placas contendo sensores de detecção fluorimétrica de oxigênio. Os resultados demonstraram que a presença dos inibidores da ATP sintase oligomicina (0,3–3  $\mu\text{g/mL}$ ) ou citreoviridina (20  $\mu\text{M}$ ) leva a subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  com conseqüente diminuição do SRC em células em suspensão ou aderidas, em meio contendo 5,5 ou 11 mM de glicose. A presença ou ausência de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino durante as análises não teve influência no efeito inibitório de bloqueadores da ATP sintase no  $\text{OCR}_{\text{max}}$ , bem como no SRC. O efeito inibitório da oligomicina sobre o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  foi abolido quando somente glutamina foi utilizada como substrato respiratório ou quando o inibidor glicolítico 2-deoxiglicose esteve presente. A concentração de ATP diminuiu e a razão ADP/ATP aumentou em células tratadas com protonóforos, mas essas alterações foram minimizadas quando a oligomicina esteve presente. Este efeito da oligomicina indica a participação da atividade reversa da ATP sintase na diminuição dos níveis de ATP e aumento da razão ADP/ATP em células tratadas com protonóforos. Tal conclusão foi corroborada utilizando-se duas concentrações de citreoviridina, onde uma baixa concentração (5  $\mu\text{M}$ ), que afeta apenas a atividade de síntese da ATP sintase não levou a subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$ , enquanto uma alta concentração (20  $\mu\text{M}$ ), que inibe tanto a atividade de síntese como o reverso da ATP sintase, resultou em subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$ . A exposição de células permeabilizadas com digitonina a ATP exógeno, mas não a ADP, resultou em inibição parcial do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  induzido por

protonóforos. Por fim, foi estabelecido que uma adição prévia de 2-deoxi-glicose à titulação do protonóforo, mesmo após a inibição do OCR basal pela oligomicina, permite que os parâmetros  $OCR_{max}$  e SRC sejam determinados sem o efeito inibitório ocasionado por inibidores da ATP sintase. Concluimos que a subestimação do  $OCR_{max}$  e SRC quando há inibição da ATP sintase está associada a uma alta atividade glicolítica e que o ATP glicolítico pode ter um efeito inibitório sobre o metabolismo de substratos respiratórios e/ou na atividade da citocromo *c* oxidase. Diante de situações onde a mitocôndria está desacoplada por protonóforos, inibidores da ATP sintase preservam o ATP intracelular pela inibição da atividade reversa deste complexo.

**Palavras chave:** ATP, consumo de oxigênio, glicólise, glioblastoma, mitocôndrias, oximetria.



## ABSTRACT

The capacity of the mitochondrial electron transport system in intact cells is frequently estimated by promoting protonophore-induced maximal oxygen consumption ( $_{\max}\text{OCR}$ ) preceded by the addition of the ATP synthase inhibitor oligomycin. This study sought to report and elucidate how ATP synthase blockers lead to underestimation of  $_{\max}\text{OCR}$  and spare respiratory capacity (SRC, i.e. the difference between  $_{\max}\text{OCR}$  and basal). Also, it was aimed to establish an experimental protocol that would allow the estimation of  $_{\max}\text{OCR}$  in the presence of ATP synthase inhibitors. The experiments were performed with cell lines, mostly with human glioblastoma cell lines (T98G and U-87MG). The oxygen consumption by suspended cells was estimated in a high-resolution oxygraph equipped with a Clark electrode, while for attached cells an automated plate reader system equipped with fluorimetric oxygen sensors was used. The results demonstrated that the presence of oligomycin (0.3-3.0  $\mu\text{g/mL}$ ) or citreoviridin (20  $\mu\text{M}$ ) led to underestimation of  $_{\max}\text{OCR}$  and a consequent decrease in SRC values in suspended or attached cells in medium containing 5.5 or 11 mM glucose. The presence or absence of sodium bicarbonate and fetal bovine serum during analyzes had no influence on the inhibitory effect of ATP synthase blockers on  $_{\max}\text{OCR}$  as well as on SRC. The inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced  $_{\max}\text{OCR}$  did not occur when glutamine was the metabolic substrate or when the glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose was present. ATP concentration was reduced and ADP/ATP ratio increased in cells treated with protonophores, but these changes were minimized when oligomycin was present. This effect of oligomycin suggests the participation of the reverse activity of ATP synthase in the decrease of ATP levels and increase in ADP/ATP ratio in protonophore-treated cells. This conclusion was corroborated by using two concentrations of citreoviridin, where a low concentration (5  $\mu\text{M}$ ), which only affects the forward activity of ATP synthase, did not lead to underestimation of  $_{\max}\text{OCR}$ , whereas a high concentration (20  $\mu\text{M}$ ), which inhibits both the forward and reverse activity of ATP synthase, resulted in an underestimation of  $_{\max}\text{OCR}$ . Exposing digitonin-permeabilized cells to exogenous ATP, but not ADP, resulted in partial inhibition of protonophore-induced  $_{\max}\text{OCR}$ . Finally, it was established that an addition of 2-deoxy-glucose previous to protonophore titration, even after inhibition of basal OCR by oligomycin, allows the determination of  $_{\max}\text{OCR}$  and SRC without the

inhibitory effect caused by oligomycin. We conclude that underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC in tumor cells when ATP synthase is inhibited is associated with high glycolytic activity and that the glycolytic ATP yield may have an inhibitory effect on the metabolism of respiratory substrates and cytochrome c oxidase activity. Under conditions where mitochondria are uncoupled by protonophores, inhibitors of ATP synthase preserve intracellular ATP levels by inhibiting the reverse activity of this complex.

**Key words:** ATP, oxygen consumption, glycolysis, glioblastoma, mitochondria, oximetry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta p$	Força eletroquímica próton-motriz
$\Delta pH_m$	Gradiente de concentração de $H^+$
$\Delta \psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
<b>2-DG</b>	2-deoxi-D-glicose
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ANT</b>	Translocador de nucleotídeos de adenina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CCCP</b>	Cianeto de carbonilo 3-clorofenil-hidrazona
<b><math>CH_3CHOHCOO^-</math></b>	Ácido láctico (íon)
<b><math>CH_3CHOHCOOH</math></b>	Ácido láctico
<b><math>CO_2</math></b>	Dióxido de carbono
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECAR</b>	<i>Extracellular acidification rate</i> ou Taxa de acidificação extracelular
<b>FAD</b>	Dinucleotídeo de flavina e adenina
<b><math>FAD^+</math></b>	Dinucleotídeo de flavina e adenina (estado oxidado)
<b><math>FADH_2</math></b>	Dinucleotídeo de flavina e adenina (estado reduzido)
<b>FCCP</b>	Carbonil cianeto-4-fenil-hidrazona
<b>FMN</b>	Mononucleotídeo de flavina
<b>GDH</b>	Glutamato desidrogenase
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b><math>H^+</math></b>	Próton de hidrogênio
<b><math>HCO_3^-</math></b>	Bicarbonato
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanosulfônico
<b>IDH</b>	Isocitrato desidrogenase
<b><math>NAD^+</math></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
<b><math>NADH</math></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
<b><math>NaHCO_3</math></b>	Bicarbonato de sódio
<b><math>NADPH</math></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>OCR</b>	<i>Oxygen consumption rate</i> ou Taxa do consumo de oxigênio
<b>OCR<sub>max</sub></b>	Taxa máxima de consumo de oxigênio
<b>Oligo</b>	Oligomicina
<b>OSCP</b>	<i>Oligomycin sensitivity-conferring protein</i>
<b>PDH</b>	Piruvato desidrogenase
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial do oxigênio
<b>RCR</b>	Taxa de controle respiratório
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SRC</b>	<i>Spare respiratory capacity</i> ou Capacidade de reserva respiratória
<b>TMPD</b>	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina
<b>UCP</b>	Proteína desacopladora

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. Mitocôndria e Metabolismo Energético .....	14
1.2. Histórico da Oximetria.....	18
1.2.1. Métodos Polarográficos.....	19
1.2.2. Métodos Manométricos .....	23
1.3. A medida do Consumo de Oxigênio nos Dias Atuais .....	25
1.4. Avaliação do Consumo de Oxigênio por Amostras Biológicas .....	29
1.4.1. Mitocôndrias Isoladas.....	29
1.4.2. Cultura de Células Intactas .....	32
1.4.3. Tecidos .....	37
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
3.1. Capítulo I - “Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells”.....	40
3.2. Capítulo II - “High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited” . ....	64
3.3. Capítulo III – Resultados Complementares.....	82
<b>4. DISCUSSÃO / CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>105</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mitocôndria e Metabolismo Energético

Células eucarióticas aeróbicas apresentam mitocôndria, uma desenvolvida maquinaria intracelular que visa principalmente a produção de energia via ATP, mas também é uma organela que participa de outros processos importantes como a homeostase redox (i.e., geração e detoxificação de espécies reativas de oxigênio - ROS), via intrínseca da morte celular por apoptose, sinalização e regulação do cálcio citosólico, biossíntese lipídica, síntese de centros de ferro e enxofre, metabolismo de carboidratos e ácidos graxos e síntese e catabolismo de metabólitos. Quaisquer anormalidades nestes processos são chamadas de disfunções mitocondriais (1-4).

Para a produção de energia, a molécula de glicose sofre transformações químicas no citosol celular sendo oxidada a piruvato, processo chamado de glicólise. Na glicólise, para cada molécula de glicose são formadas duas moléculas de piruvato com um rendimento energético de duas moléculas de ATP e duas de NADH. Em situações de normóxia, o piruvato formado é translocado para a matriz mitocondrial onde sofre uma descarboxilação oxidativa pelo complexo da piruvato desidrogenase sendo sintetizado o acetil-coenzima A, que posteriormente se condensará ao oxalacetato formando citrato, dando início ao ciclo do ácido cítrico. No ciclo do ácido cítrico são formadas as coenzimas reduzidas NADH (três) e  $\text{FADH}_2$ , além de GTP (5-7).

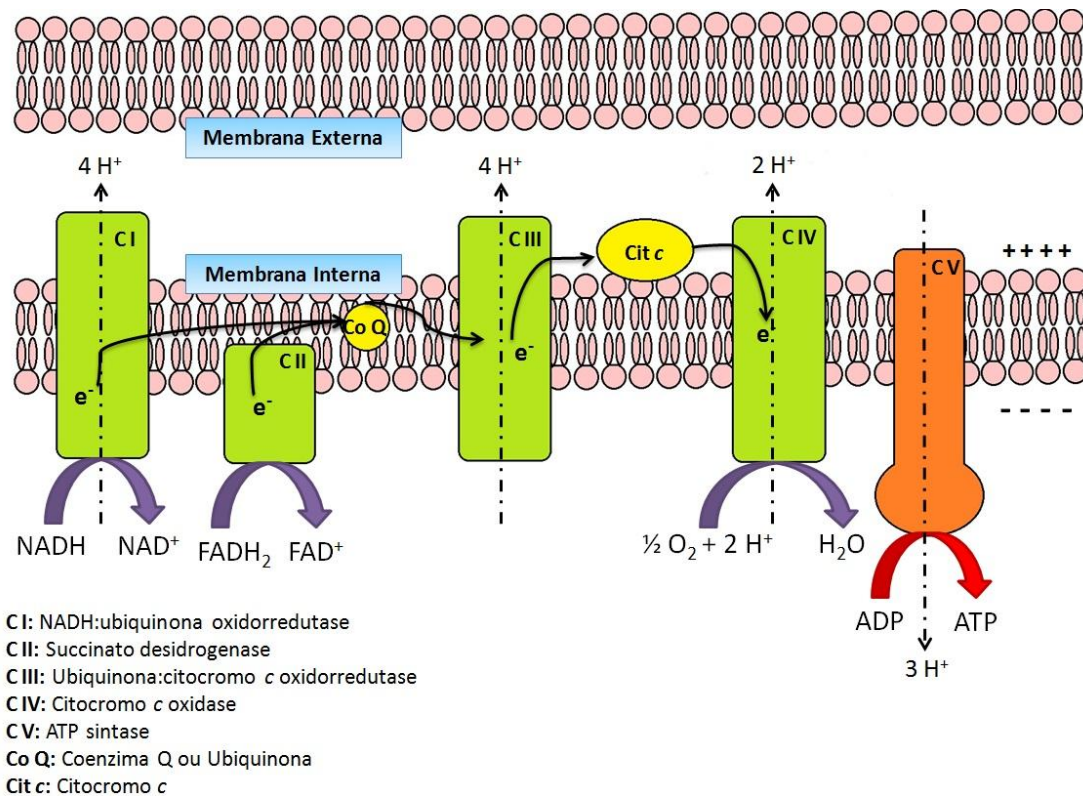
O ciclo do ácido cítrico se trata de uma rota anfibólica, ou seja, possui reações catabólicas e anabólicas. As reações catabólicas compreendem as vias de degradação de moléculas a fim de se obter energia, já as anabólicas conduzem à síntese de moléculas complexas a partir de moléculas mais simples. Quando intermediários são desviados do ciclo do ácido cítrico para outras vias biossintéticas, estes intermediários são reabastecidos por várias reações anapleróticas (5). Em circunstâncias normais, as reações pelas quais os intermediários do ciclo são desviados para outras vias e aquelas pelas quais eles são reabastecidos estão em equilíbrio dinâmico, de modo que as concentrações dos intermediários do ciclo do ácido cítrico permanecem quase constantes. Dentre as reações anapleróticas se destaca a desaminação da glutamina para a produção e consequente

reabastecimento de  $\alpha$ -cetoglutarato. A glutamina sofre uma primeira desaminação pela glutaminase formando o glutamato e o glutamato sofre uma segunda desaminação formando o  $\alpha$ -cetoglutarato pela ação da glutamato desidrogenase ou por uma desaminação ácida (5). Notadamente, o metabolismo de glutamina se constitui importante fonte de intermediários do ciclo do ácido cítrico em células tumorais. Estes intermediários podem ser utilizados para vias biossintéticas, como a síntese de ácidos graxos, como para o metabolismo oxidativo (8).

Na membrana mitocondrial interna, as coenzimas NADH e  $\text{FADH}_2$  provenientes do ciclo do ácido cítrico são oxidadas transferindo seus elétrons para os complexos respiratórios I e II, respectivamente. O oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) é o aceptor final de elétrons de uma série de transferências de elétrons através de proteínas que compreendem a chamada cadeia respiratória (5-7, 9). A cadeia respiratória compreende quatro complexos multienzimáticos denominados de complexos I, II, III e IV além da coenzima Q, citocromo c e ATP sintase (complexo V) (4, 5). Os complexos respiratórios se diferenciam pelos seus co-fatores e grupos prostéticos. O complexo I, o maior deles, apresenta um mononucleotídeo de flavina (FMN) e 22 a 24 proteínas ferro-enxofre nos domínios 5-7, já o complexo II contém dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), 7 a 8 proteínas ferro-enxofre em três domínios e citocromo  $b_{560}$ . O complexo III é composto pelo citocromo  $b$ , citocromo  $c_1$  e uma proteína ferro-enxofre e fazem parte do complexo IV os citocromos  $a$  e  $a_3$  e dois íons de cobre (2, 7, 10). É proposto que quando dois elétrons passam pelos complexos I e III, quatro prótons ( $\text{H}^+$ ) são transportados em cada complexo da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Os elétrons são então utilizados para reduzir o  $\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}$  no complexo IV (2). Para reduzir o  $\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}$ , no complexo IV também ocorre a transferência de quatro  $\text{H}^+$  para o espaço intermembranar, no entanto o próprio complexo utiliza dois desses  $\text{H}^+$  para a formação da molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , sendo então transportados somente dois  $\text{H}^+$  (5).

Os  $\text{H}^+$  transferidos para o espaço intermembranar mitocondrial por estes complexos respiratórios, acoplados à transferência de elétrons através destes mesmos complexos, mantêm a força eletroquímica próton-motriz ( $\Delta p$ ) que compreende um gradiente de concentração de  $\text{H}^+$  ( $\Delta \text{pH}_m$ ) e um gradiente elétrico (o potencial de membrana mitocondrial,  $\Delta \psi_m$ ) através da membrana interna. Estes gradientes permitem que o  $\text{H}^+$  flua de volta para a matriz mitocondrial através da

ATP sintase, acoplado à síntese de ATP a partir de ADP e fosfato (2, 4, 6, 9, 11). O processo de síntese de ATP pela mitocôndria é denominado fosforilação oxidativa (**Fig. 1**), cujo rendimento energético é de aproximadamente 32 moléculas de ATP por molécula de glicose (5) e descreve o acoplamento entre a oxidação do substrato respiratório com a fosforilação do ADP (2).



**Figura 1:** Cadeia respiratória mitocondrial ilustrando o processo de fosforilação oxidativa.

Uma vez que a fosforilação oxidativa e a cadeia transportadora de elétrons precisam ser avaliadas, métodos que permitem acompanhar o consumo de oxigênio em tempo real, avaliações do potencial elétrico transmembrana e medidas da produção de ATP são comumente adotados. Nessas avaliações são utilizados diversos substratos respiratórios e inibidores de complexos respiratórios e da ATP sintase para se estimar a participação de cada um deles no processo como um todo. Em células intactas se utiliza como substratos respiratórios a glicose, glutamina e piruvato; enquanto que em células permeabilizadas pode se utilizar uma diversidade de substratos para os complexos respiratórios, como apresentado na **Tabela I** (12).



Classificação	Composto	Alvo / Modo de Ação
Substrato	Fumarato	Intermediário do ciclo do ácido cítrico
	Piruvato	Nutre ciclo do ácido cítrico via acetil-CoA
	Glutamato	Pela ação da transaminase glutâmico oxalacética (TGO) se converte em $\alpha$ -cetoglutarato e aspartato. Pela glutamato desidrogenase (GDH) é convertido a $\alpha$ -cetoglutarato
	$\alpha$ -Cetoglutarato	Intermediários do ciclo do ácido cítrico
	Malato	
	Succinato	Substrato oxidado no Complexo II
	TMPD/ Ascorbato	Substrato para Complexo IV. Doa elétrons para o citocromo <i>c</i>
Inibidor	Rotenona	Complexo I (inibe a transferência de elétrons do centro ferro-enxofre do Complexo I para coenzima Q)
	Piericidina	
	Malonato	Complexo II: inibe a oxidação do succinato
	Antimicina A	Complexo III (impede a transferência de elétrons do citocromo <i>b</i> do Complexo III para o citocromo <i>c</i> )
	Mixotiazol	Complexo III (impede o fluxo de elétrons de QH <sub>2</sub> para a proteína ferro-enxofre de Rieske)
	Cianeto (KCN)	Complexo IV
	Oligomicina	ATP sintase: inibe as subunidades F <sub>o</sub> e CF <sub>o</sub>
	Venturicidina	
	Aurovertina B	ATP sintase: inibe a subunidade F <sub>1</sub>
	Citreoviridina	ATP sintase: inibe a subunidade F <sub>1</sub> . Concentrações baixas inibem a síntese de ATP, concentrações altas inibem tanto a síntese como a hidrólise de ATP
	Atractilosídeo	Translocador de nucleotídeos de adenina (ANT): inibe a troca de ATP-ADP
Protonóforo e desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial	FCCP	Membrana mitocondrial interna: carreadores hidrofóbicos de prótons
	CCCP	
	2,4-Dinitrofenol	

**Tabela I:** Substratos e inibidores comumente utilizados durante metodologias que verificam o consumo de oxigênio mitocondrial (2, 5, 12, 13).

Apesar de sua relativa simplicidade, as medidas de consumo de oxigênio são as que fornecem dados mais fidedignos à função mitocondrial, produzindo uma medida integrativa de complexas vias metabólicas acopladas. A respirometria reflete a função das mitocôndrias como organelas estruturalmente intactas, fornecendo uma medida dinâmica do fluxo metabólico, em contraste com determinações estáticas, como de concentrações de metabólitos, expressão ou atividade de enzimas, estado redox, potencial de membrana ou concentração de moléculas sinalizadoras. A compreensão do controle respiratório mitocondrial, por sua vez, requer modulações experimentais de concentração de substratos, potenciais eletroquímicos e atividades enzimáticas (12, 14).

O forte acoplamento entre a transferência de elétrons e a transferência de prótons nas mitocôndrias significa que, para um determinado substrato, a taxa de utilização de oxigênio mitocondrial é uma medição precisa do circuito de prótons através da membrana mitocondrial interna. Experimentos podem ser planejados para se obter informações sobre uma ampla variedade de processos, incluindo transporte de substratos para a célula, metabolismo citoplasmático, transporte de substratos para a mitocôndria, metabolismo mitocondrial, fornecimento de elétrons para a cadeia respiratória, atividades dos complexos I ou II, complexo III ou complexo IV, síntese de ATP, vazamento de prótons, exportação de ATP para o citoplasma e utilização de ATP celular. Com esses múltiplos parâmetros para analisar com a medida do consumo de oxigênio, esse método se tornou o mais utilizado para se estudar e reconhecer disfunções mitocondriais (1).

## **1.2. Histórico da Oximetria**

Historicamente, a oximetria em materiais biológicos se deu com duas metodologias principais, a polarográfica e a manométrica. Eletrodos utilizados atualmente são baseados no método polarográfico, já o método manométrico, apesar de ter contribuído para avanços importantes no entendimento do metabolismo oxidativo, já não é mais utilizado. A seguir, apresenta-se um histórico sobre o uso de estes métodos.

### 1.2.1. Métodos Polarográficos

O estudo e a extração por vácuo dos gases sanguíneos começaram a ser realizados há mais de 300 anos e há cerca de 200 anos esses gases sanguíneos se tornaram conhecidos. No entanto, inicialmente, o estudo dos gases sanguíneos contribuiu pouco para o tratamento de pacientes, sendo de maior valia para o tratamento de condições de baixa oxigenação sanguínea (hipóxia) a detecção de cianose e a medição da coloração sanguínea. Depois da segunda guerra mundial, médicos e fisiologistas buscaram desenvolver um método para analisar a gasometria sanguínea e medir a pressão parcial do oxigênio ( $pO_2$ ), que posteriormente seria chamado de método polarográfico (15).

A redução eletroquímica do  $O_2$  foi descoberta por Heinrich Danneel e Walter Nernst em 1897 (2, 15). Nernst sugeriu ao seu assistente Danneel que investigasse as propriedades de eletrodos únicos usando um grande eletrodo de referência não-polarizável para retornar a corrente da solução para o circuito externo. O que foi observado é que o  $O_2$  na solução reagiu com metais carregados negativamente. Eles ainda demonstraram uma relação aproximadamente linear entre a pressão parcial de  $O_2$  e corrente quando utilizou dois eletrodos de platina com uma voltagem de 20 mV entre eles. Essa descoberta levou Danneel e outros pesquisadores a utilizarem eletrodos de platina para medir o  $O_2$  em meios biológicos, no entanto, foi observado que a corrente caía devido ao fato destes eletrodos estarem contaminados ou revestidos por proteínas, levando essa abordagem a ser descontinuada (15).

A polarografia descendente do mercúrio foi descoberta acidentalmente por Jaroslav Heyrovsky em 1922. Heyrovsky estava estudando certas irregularidades relacionadas à capilaridade do mercúrio, estudo que levou à invenção do polarógrafo. O pesquisador deixou o mercúrio fluir através de um capilar de vidro e pesou as gotas medindo a corrente elétrica obtida quando uma tensão gerada pela força eletromotiva era aplicada entre o mercúrio no capilar e ao que se acumulava ao fundo. O mercúrio se acumulava em uma solução salina através da qual a corrente elétrica fluía. Através deste método poderiam ser averiguadas diversas substâncias dissolvidas na água (mesmo que em pequenas quantidades) e ainda medir a porcentagem das mesmas. Em 1925, Heyrovsky e M. Shikata publicaram uma descrição de um equipamento automatizado que gravava a relação

entre a aplicação de uma voltagem e a corrente resultante. Um motor fonógrafo elevava a voltagem gradualmente girando um potenciômetro que movia simultaneamente um filme fotográfico localizado atrás de uma fenda iluminada por um espelho de galvanômetro. Cada espécie reduzida formava um platô que podia ser identificada e quantificada pela altura do degrau que formavam. Esse método produziu os primeiros valores de tensão de  $O_2$  medidos no plasma e no sangue na década de 1940 (15).

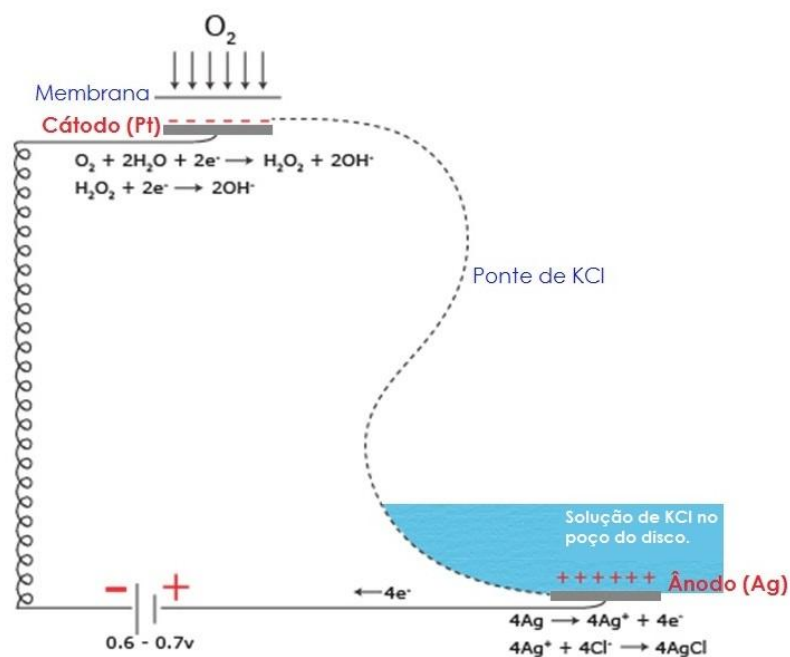
A partir de 1940, a implantação de eletrodos de platina em tecidos permitiu o estudo do suprimento ou disponibilidade de  $O_2$ , em uma abordagem amperométrica. No entanto, esses eletrodos nus se tornaram contaminados quando imersos no sangue tendo como principal problema a diminuição da resposta eletroquímica (2, 15). Bronk e Brink reproduziram um método eletrolítico para medir oxigênio dissolvido (15). A princípio, mediam o consumo de oxigênio através de uma superfície carregada negativamente (cátodo), onde o mesmo era reduzido, gerando uma pequena diferença de potencial e a corrente de eletrólise era proporcional à concentração de  $O_2$  em solução. Ao longo dos anos, algumas melhorias técnicas do eletrodo de  $O_2$  foram realizadas e Davies e Brink (15, 16) foram os primeiros a usarem eletrodos de platina cobertos por uma membrana semipermeável de colódio, permeável tanto a íons quanto ao  $O_2$ . Essa medida fazia com que a corrente fosse proporcional à pressão parcial de  $O_2$  presente na amostra, que não podia ser agitada (15).

No início da década de 1950, diversos pesquisadores estavam utilizando cátodos de platina em tecidos para medir o  $O_2$ . No entanto, esses cátodos eram conhecidos por contaminarem o sangue. Leland C. Clark previu que uma camada de membrana de celofane poderia deter a contaminação e provavelmente manter proteínas longe do cátodo, mas que o  $O_2$  poderia passar (15, 17). Clark inseriu um cátodo de platina em vidro e utilizou diversos materiais de membrana: primeiramente celofane e posteriormente testou membranas de silastic e polietileno. Dessa forma, a contaminação foi prevenida, mas mais importante foi o fato das membranas limitarem a quantidade de  $O_2$  que poderia ser consumida do meio líquido pelo eletrodo, tornando assim possível quantificar e monitorar a pressão parcial de  $O_2$  na amostra, sendo ela sangue, solução ou gases (15).

Em 1954, Clark construiu o primeiro protótipo do eletrodo de  $O_2$  feito com platina e fio de prata revestidos por vidro, imersos em solução de cloreto de potássio e cobertos por uma membrana de polietileno. O circuito era formado por uma bateria, duas resistências e um galvanômetro de corda (15, 17). Este eletrodo teve grande repercussão na clínica médica sendo utilizado para monitorar o  $O_2$  gasoso, medir a pressão parcial de  $O_2$  sanguíneo, determinar o teor de  $O_2$  no sangue e estudar curvas de dissociação da hemoglobina. Ainda ajudou no monitoramento de  $O_2$  transcutâneo em prematuros e apresentou uma série de utilidades em pesquisas científicas de cultura celular e genética molecular. Posteriormente, o uso deste eletrodo, então chamado de eletrodo de Clark, se estenderia para a indústria alimentícia na produção de vinhos e cervejas, para a aviação e vôo espacial, para análise química do solo e gerenciamento de esgoto. Foi esta invenção que levou à introdução de aparelhos mais modernos que medem o consumo de  $O_2$  em solução (15).

Posteriormente estes eletrodos foram comercializados pela empresa “*Yellow Springs Instrument Company*” e até os dias atuais são utilizados (15, 18). Este eletrodo compreende um cátodo de platina relativamente grande e um ânodo de prata que circunda a platina estando imersos e eletricamente conectados por uma solução eletrolítica. Ambos os eletrodos são colocados em um disco de plástico (resina de epoxi) e são protegidos por uma fina membrana de teflon ou polietileno. A membrana é esticada suavemente sobre a superfície do cátodo de platina e é fixada por um anel de borracha. A membrana também retém uma fina camada de eletrólito (solução que, usualmente, contém 2M cloreto de potássio) sobre a superfície dos eletrodos, fazendo uma ponte eletrolítica entre os dois metais. Quando uma pequena voltagem é aplicada através desses eletrodos, de modo a tornar a platina carregada negativamente em relação à prata, a corrente que flui é inicialmente desprezível e a platina se torna polarizada (10, 18, 19). Os íons de prata se combinam com a solução de íons cloreto, precipitando cloreto de prata sobre o eletrodo de prata (2). À medida que essa voltagem é aumentada para 600-700 mV, o  $O_2$  é reduzido na superfície da platina gerando peróxido de hidrogênio, de modo que o eletrodo de platina tende a se descarregar à medida que os elétrons são doados ao  $O_2$ . A saber, a permeabilidade da membrana ao  $O_2$  e a redução deste no eletrodo de platina são uma função linear de sua concentração no meio. A corrente que então

flui é estequiometricamente relacionada ao  $O_2$  reduzido no cátodo e essa corrente é convertida em um sinal elétrico e pode ser gravado analogicamente, ou a corrente de saída do eletrodo pode passar por um conversor analógico-digital e, posteriormente, ser analisada por um transdutor de sinal acoplado a um computador (**Fig. 2**) (2, 10, 19).



**Figura 2:** Diagrama representando as reações do oxigênio molecular no eletrodo de Clark (Adaptado de ref. 19).

Para ser utilizado convenientemente, o eletrodo de  $O_2$  deve estar em contato com o material biológico em estudo. Para isso um dispositivo de vidro ou acrílico contendo duas câmaras foi amplamente utilizado, onde na câmara externa circula água termostatizada permitindo o controle da temperatura nos experimentos. Já na câmara interna, de volume entre 1 a 3 mL, é onde se coloca a amostra biológica que se quer estudar e o sensor de oxigênio é fixado de forma que seu terminal envolto por uma membrana fique em contato com o meio em que a amostra está inserida. Todo o conjunto é colocado sobre um agitador magnético para facilitar a difusão do oxigênio na superfície da membrana e a câmara interna é fechada com uma tampa de forma que não fique espaço algum entre ela e o meio da amostra. A tampa contém um pequeno orifício (a difusão de oxigênio por esse orifício é

desprezível) por onde pode ser realizada adições de substratos e inibidores através de micropipetas ou microseringas (10, 18).

Antes do eletrodo de Clark ter importância nos estudos de metabolismo oxidativo mitocondrial, ele foi precedido por métodos manométricos de estimativa de  $O_2$  em solução. O princípio destas técnicas é apresentado a seguir.

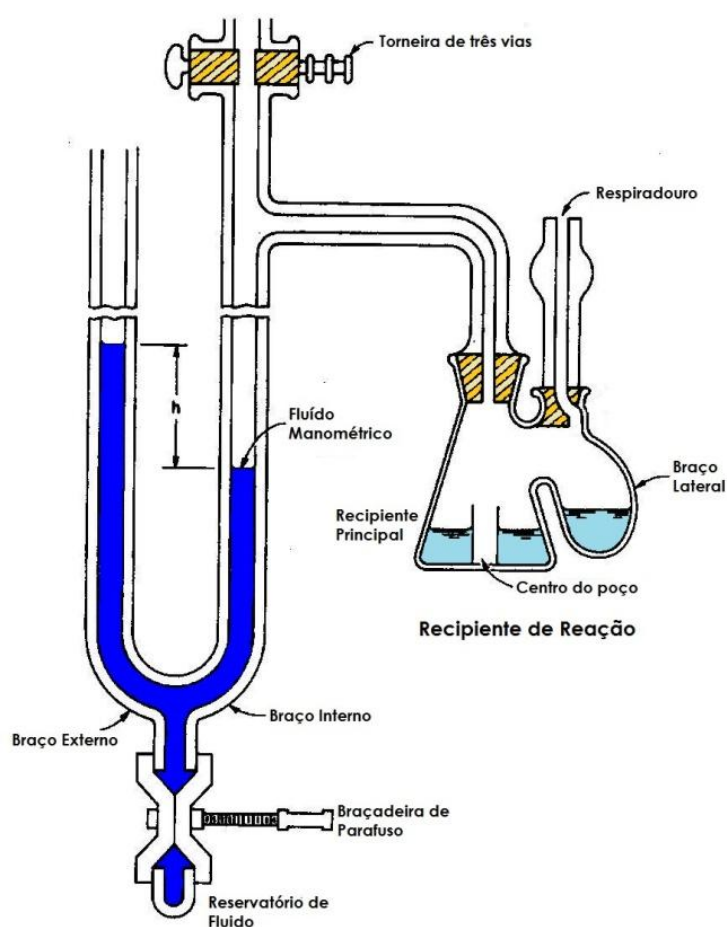
### 1.2.2. Métodos Manométricos

Por volta dos anos de 1940, os métodos mais convenientes para se estudar reações nas quais gases eram absorvidos ou liberados eram os métodos manométricos. Por definição, a reação que se queria estudar ocorria em um recipiente fechado com uma amostra biológica, ligado a um tubo com um aferidor de pressão; dentro deste tubo havia um líquido por meio do qual as mudanças na quantidade de gás no recipiente poderiam ser medidas quantitativamente pela mudança na altura deste líquido a medida que a pressão se alterava (20).

Esses métodos foram amplamente utilizados nos estudos de medidas de absorção de  $O_2$  e liberação de  $CO_2$  em células e tecidos, sendo fundamentais para a elucidação do mecanismo de respiração celular.

Os manômetros utilizados eram de três tipos principais. No primeiro tipo de manômetro, o gás contido no compartimento era mantido a uma pressão constante ajustando o volume do líquido presente no tubo em que o recipiente ficava acoplado e a mudança do volume era lida fora do tubo. O chamado manômetro de Warburg (**Fig. 3**), apresentava o recipiente acoplado a uma extremidade de um tubo manométrico em forma de U e sua outra extremidade comunicava-se livremente com a atmosfera. O líquido presente no tubo era ajustado para se manter constante o volume do gás e a mudança de pressão era estimada. Em conformidade, era calculado a quantidade de gás produzido ou absorvido. O terceiro tipo de manômetro, chamado de Barcroft, não funcionava à pressão ou volume constantes, ambos mudavam simultaneamente. Nesta variedade, a outra extremidade do tubo manométrico em forma de U que ficava livre para a atmosfera no manômetro de Warburg, agora era acoplada a um segundo recipiente parecido com o primeiro; projetado para eliminar erros devido a variáveis como pequenas mudanças de temperatura (20).

O manômetro de Warburg ficou assim conhecido pela sua vasta utilização pelo pesquisador alemão Otto Warburg e seus colaboradores (20, 21). Warburg utilizava este método para o estudo da captação de  $O_2$  e produção de  $CO_2$ , que é equivalente à produção de ácido láctico, a partir de tampões que continham bicarbonato, de acordo com a reação a seguir:  $CH_3CHOHCOOH + HCO_3^- \rightarrow CH_3CHOHCOO^- + H_2O + CO_2$ . A técnica constituía em um recipiente no qual uma fatia de tecido, cortado por uma lâmina de barbear, era sobreposta em uma agulha de vidro que estava fixada no fundo do recipiente e que ficava submersa em solução de Ringer (21).



**Figura 3:** Manômetro de Warburg. Durante a medição, as conexões externas do recipiente permanecem fechadas, registrando a mudança de pressão no manômetro (pela diferença na altura do líquido contido no tubo onde estava acoplado o manômetro) (Adaptado de ref. 22).

Para os estudos de captação de  $O_2$ , 0,1 mL de solução de hidróxido de potássio a 5% eram adicionados ao recipiente para consumir o  $CO_2$  formado no processo de respiração e o manômetro registrava uma diminuição na pressão ao



longo do tempo, uma vez que o  $O_2$  era consumido e o  $CO_2$  removido. Já para o estudo da produção de ácido láctico, Warburg utilizava solução de Ringer suplementada com 24 mM de bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) e o manômetro acusava um aumento da pressão devido à emissão de gás carbônico. Tanto a captação de  $O_2$  como a liberação de  $CO_2$  eram medidas a uma temperatura de  $37,5^\circ C$  entre 30 a 60 minutos. Warburg ainda calculou que para se evitar a anaerobiose no centro do tecido, este deveria ter uma espessura entre 0,2 e 0,4 mm e um peso que variava de 2 a 5 mg (21).

### **1.3. A Medida do Consumo de Oxigênio nos Dias Atuais**

Como descrito anteriormente, a respiração mitocondrial ocorre na membrana mitocondrial interna e se processa pelo fluxo de elétrons através dos complexos respiratórios, resultando na fosforilação do ADP à ATP, processo chamado de fosforilação oxidativa (5, 9, 11, 23). Qualquer alteração em algum dos complexos respiratórios ou em algum componente que participe ativamente na fosforilação oxidativa, como, por exemplo, o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) que promove a troca de ADP do citosol celular para a matriz mitocondrial com o ATP da matriz mitocondrial para o citosol celular, pode resultar em alguma disfunção mitocondrial (9, 23).

Atualmente ainda se utiliza para a análise do metabolismo mitocondrial o eletrodo clássico de oxigênio. Este sistema levou a um grande entendimento do funcionamento da respiração mitocondrial. Embora esse sistema seja uma ferramenta relativamente barata e que muito contribuiu para o entendimento da função respiratória mitocondrial, há limitações quanto ao seu uso como a estabilidade do sinal e a sua resolução (23).

Para a verificação da função mitocondrial existem inúmeros ensaios bioquímicos, dentre eles, medidas da atividade enzimática dos complexos respiratórios e de enzimas do ciclo do ácido cítrico, determinação do potencial elétrico de membrana, análise da expressão de proteínas por western blot, eletroforese em gel de poliacrilamida nativa azul (não rompem as pontes dissulfeto e os complexos respiratórios podem ser visualizados na íntegra), ensaios de espécies reativas de oxigênio e ensaios de conteúdo de ATP. No entanto, vários destes

ensaios não podem ser realizados em tempo real e são destrutivos para células e tecidos. Considerando a necessidade de se avaliar o processo como um todo da fosforilação oxidativa, foram desenvolvidos dois novos sistemas que permitem a detecção de mudanças na respiração mitocondrial com alta resolução: *Oxygraph-2k* (O2k; OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria) e *Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse XF; Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Ambos os equipamentos podem avaliar a função mitocondrial em tempo real em diversos modelos experimentais, como em mitocôndrias isoladas, cultura de células ou em tecidos e cada equipamento possui vantagens e desvantagens em suas análises como apresentadas na **Tabela II** e percorridas ao longo do texto.

Especificidades do Equipamento	<i>Oxygraph-2k</i>	<i>Seahorse XF</i>
<b>Custo do equipamento (US\$)</b>	40.000	125.000
<b>Automação</b>	Permite parcial	Sim
<b>Calibração Interna</b>	Não	Sim
<b>Medidas</b>	O <sub>2</sub> ; outras medidas requerem acessórios (p.ex. pH e fluorescência)	O <sub>2</sub> e pH
<b>Formato do ensaio</b>	2 cubas com medidas simultâneas	Placa de 24 ou 96 poços com medidas simultâneas
<b>Alta Sensibilidade</b>	Sim, sensores polarográficos	Sim, sensores de fluorescência
<b>Tempo de ensaio</b>	Longo, de 30 a 60 minutos a cada duas amostras	Curto, 90 minutos para 24 ou 96 amostras
<b>Temperatura Controlada</b>	Sim (2°C a 45°C)	Sim (16°C a 42°C)
<b>Substratos injetados por ensaio</b>	Ilimitados	Até quatro
<b>Custo por ensaio</b>	Barato: substratos e reagentes	Caro: substratos e reagentes, placas com os detectores de fluorescência
<b>Material Biológico</b>	Em suspensão	Aderido à placa

**Tabela II:** Comparação de especificações técnicas entre o *Oxygraph-2k* e *Seahorse XF* (adaptado de ref. 23).

É notável que desde o aparecimento destas tecnologias houve um considerável aumento da avaliação da função mitocondrial na patogênese de doenças (4, 23, 24). O *Oxygraph-2k* foi desenvolvido em meados dos anos 1990 e é um equipamento produzido a partir do eletrodo de oxigênio tradicional, sendo utilizado para medidas da respiração mitocondrial. O sistema possui duas cubas separadas de 2 mL equipadas com um sensor polarográfico de oxigênio, que permitem a determinação em tempo real tanto da concentração de oxigênio (nmol/mL) quanto da taxa de consumo de oxigênio (pmol/seg/mL) dentro de cada câmara. A capacidade de detecção em alta resolução é reforçada por ambas as cubas apresentarem uma difusão de oxigênio com o ambiente bastante reduzida, por possuírem um mecanismo de agitação constante e um sistema de controle de temperatura, permitindo que as medidas respiratórias possam ser realizadas em uma faixa de 2°C a 45°C (14, 23).

A grande vantagem do *Oxygraph-2k* é o fato de que cada complexo do sistema de transferência de elétrons pode ser estudado de forma independente, usando-se diferentes combinações de substratos e inibidores para que seja elucidado como estes impactam no metabolismo da amostra, uma vez que as injeções são realizadas manualmente. Além disso, ajustes em concentrações de amostras, substratos e inibidores podem ser realizados à medida que o experimento está em andamento (14, 23). No entanto, o fato do sistema não ser (ou ser parcialmente) automatizado, também pode trazer desvantagens uma vez que o operador precisa estar constantemente monitorando e ajustando as concentrações dos reagentes para se obter a intensidade ideal do sinal. Além do mais, somente duas amostras podem ser analisadas simultaneamente pela limitação de cubas que o equipamento oferece, fazendo com que o tempo de experimento aumente significativamente e conseqüentemente ocorra um potencial erro associado a um declínio da viabilidade da suspensão celular ao longo do experimento. É necessária uma quantidade significativamente maior de amostras, o que pode ser limitante quando se trabalha com cultura primária de células (25). Outra limitação do equipamento é que requer um acessório para se realizar medidas extracelulares de pH, sendo esta medida importante quando se quer determinar a taxa glicolítica de uma amostra (4, 23, 26).

O *Seahorse XF* passou a ser comercializado em 2006, atendendo a necessidade da realização de múltiplas análises automatizadas em simultâneo para a avaliação da função mitocondrial. O equipamento opera analisando placas de 24 ou 96 poços, onde uma única placa contendo múltiplas amostras pode ser analisada (23). O equipamento utiliza um sistema de detecção múltiplo contendo em cada um deles dois sensores de fluorescência, um que mede as concentrações extracelulares de oxigênio, portanto medindo a taxa do seu consumo em pmol/seg/mL (OCR) e outro que mede a taxa de acidificação extracelular medida em unidades de mili-pH/min (ECAR) (4, 23, 27). Através da medida do ECAR é possível calcular a liberação de lactato sob certas condições e, portanto, a taxa de glicólise anaeróbica (4, 28). Um pistão que contém fibra óptica se encaixa sobre os sensores de fluorescência e realiza em simultâneo as medições do OCR e ECAR dentro de uma câmara selada por 2 a 6 minutos. Depois da medida, o pistão sobe e a câmara então não fica vedada, permitindo que o O<sub>2</sub> se reequilibre aos níveis atmosféricos, e novamente o pistão desce e sela a câmara para repetir as medições. Os movimentos do pistão também têm por utilidade a agitação e mistura do meio extracelular (4, 23, 27). Os reagentes são distribuídos em quatro injetores e são sequencialmente injetados em cada poço da placa (23, 26).

Uma importante vantagem desta metodologia é a realização de medidas em células aderidas à placa, mantendo o ambiente onde estas foram plaqueadas (24). Também permite que algumas células, como neurônios, sejam analisadas sem sofrerem lesões provocadas pela tripsinização e remoção das placas de cultura (23, 29). A desvantagem principal desta metodologia é estar limitada a apenas quatro adições por traçado experimental. Justamente por ser um equipamento automatizado e com restrições de injeções, a otimização experimental (quantidade de material biológico e concentração dos reagentes) deve ser realizada previamente e o custo para essa otimização e pelos ensaios subsequentes são altos em comparação com o *Oxygraph-2k*. As placas que contém os sensores de fluorescência são caras e precisam ser substituídas após a conclusão de cada ensaio. Outra desvantagem é que após a conclusão experimental, uma normalização pela quantidade de material biológico precisa ser realizada, como dosagem de proteínas por Bradford ou quantificação de DNA por cristal de violeta (28). Uma última desvantagem é que os compostos que possuem cor podem

interferir na medida de fluorescência, como é o exemplo dos protonóforos FCCP e CCCP, ou com a placa de plástico, podendo produzir dados errôneos (23, 30).

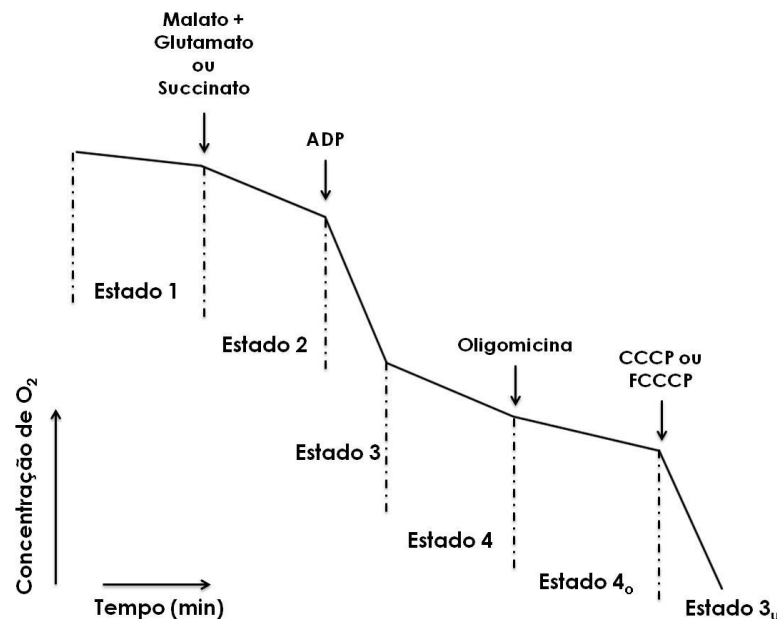
#### 1.4. Avaliação do Consumo de Oxigênio por Amostras Biológicas

O estudo do metabolismo celular e, especificamente, dos parâmetros bioenergéticos mitocondriais fornece uma maior compreensão das disfunções metabólicas associadas à progressão de muitas doenças. Para este tipo estudo, como descrito anteriormente, são comumente utilizados dois sistemas, o *Oxygraph-2k* e o *Seahorse XF*. Estes sistemas são utilizados para analisar disfunções mitocondriais em diversas amostras biológicas, que apresentam prós e contras metodológicos como descritos a seguir (23).

##### 1.4.1. Mitocôndrias Isoladas

A definição dos estados respiratórios mitocondriais, primeiro propostas por Chance e Williams (31), evoluíram e novos parâmetros de função mitocondrial podem ser obtidos por injeções sequenciais de diferentes substratos para mitocôndrias isoladas. Estes substratos podem estimular o fluxo de elétrons em diferentes complexos do sistema transportador de elétrons, facilitando a identificação de um complexo que apresenta uma disfunção em seu funcionamento (1, 23).

Por definição, existem quatro estados respiratórios que são utilizados como parâmetros para avaliar a função de mitocôndrias em condições em que estas estão fosforilando e em repouso (**Fig. 4**) (31). O *estado 1* é descrito quando a mitocôndria está consumindo oxigênio pela oxidação de seus próprios substratos endógenos, o *estado 2* é dado pela respiração mitocondrial na presença de substratos exógenos e o *estado 3* é desencadeado em uma suspensão de mitocôndrias isoladas pela adição de ADP. O aumento da respiração no *estado 3* é resultado do uso da força próton motriz para a síntese de ATP, a qual é restaurada pela atividade aumentada da transferência de prótons pelos complexos da cadeia respiratória. Quando todo ADP adicionado é fosforilado a ATP pela ação da ATP sintase, a respiração retorna para ou perto dos valores iniciais anteriores à adição de ADP. O novo estado respiratório é agora denominado *estado 4* (2).



**Figura 4:** Esquema ilustrativo dos diferentes estados respiratórios mitocondriais. Para explicação, ver texto.

Na prática, a presença de ATP no meio de incubação pode ter efeitos adicionais ao *estado 4*. A atividade reversa da ATP sintase (ou seja, catalisando a hidrólise de ATP) impedirá o restabelecimento de uma respiração baixa. Por essa razão, a respiração do *estado 3* pode ser finalizada pela adição do inibidor da ATP sintase, oligomicina, inibindo tanto o processo de fosforilação do ADP à ATP, quanto sua atividade de ATPase, atingindo-se o *estado 4<sub>o</sub>* (*estado 4<sub>oligomicina</sub>*). A adição de oligomicina pode ser seguida pela adição de uma concentração de um protonóforo que foi previamente titulada para proporcionar a máxima respiração desacoplada (*estado 3<sub>u</sub>*) (1).

O *estado 3<sub>ADP</sub>* é controlado pela atividade de fosforilação do ADP a ATP, processo que envolve principalmente a translocase de nucleotídeos de adenina, o carreador de fosfato e a ATP sintase. Também é controlado pela oxidação de substratos, o que incluiu a captação de substratos, atividade de enzimas e de complexos da cadeia transportadora de elétrons e a disponibilidade de coenzima Q, citocromo *c* e  $O_2$ . Já o *estado 3<sub>u</sub>* é controlado exclusivamente pela oxidação de substratos e é útil para se detectar disfunções em componentes da cadeia respiratória. Diferentes substratos permitem que múltiplas vias metabólicas ou complexos respiratórios sejam analisados (1).

O *estado 4* é controlado predominantemente pelo vazamento de prótons e por quaisquer ATPases contaminantes que reciclem o ATP sintetizado em ADP e, em menor grau, pela atividade de oxidação do substrato. O *estado 4<sub>o</sub>* é controlado pela atividade do vazamento de prótons e, em menor grau, pela oxidação de substrato, uma vez que as concentrações de ATP não irão se alterar com a utilização de oligomicina. Uma baixa velocidade de respiração no *estado 4<sub>o</sub>* é indicativa que as mitocôndrias mantêm uma força próton elétron motriz suficientemente alta para restringir a transferência de elétrons. Uma taxa mais elevada de respiração no *estado 4<sub>o</sub>* sinaliza um vazamento de prótons alterado *in vivo* ou que técnicas de isolamento mitocondrial foram realizadas de forma inadequada (1).

Um parâmetro bastante utilizado para se avaliar o comportamento das mitocôndrias neste experimento clássico é o RCR mitocondrial (taxa de controle respiratório, definido como a respiração no *estado 3* dividida pelo *estado 4*) (32). Mitocôndrias "saudáveis" sob condições corretas de incubação apresentam um alto controle respiratório, ou seja, um grande aumento na taxa de respiração com ADP seguido por um retorno ao *estado 4*, o que indica que essas mitocôndrias têm uma alta capacidade de oxidação de substratos acoplada à fosforilação do ADP à ATP e um baixo vazamento de prótons. Entretanto, não há um valor absoluto de RCR que seja diagnóstico de mitocôndrias disfuncionais, porque os valores são dependentes do substrato e do tecido que a mitocôndria tenha sido isolada (1, 2). Se as taxas absolutas de respiração e o RCR não forem afetados por um tratamento ou quando se está testando algum fármaco, é seguro afirmar que não há nenhuma disfunção bioenergética, mas uma vez que há uma disfunção no RCR é indicativo de uma mudança na fosforilação oxidativa e experimentos adicionais serão necessários para identificar as causas primárias (1).

O estudo da integridade funcional e da capacidade de fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas se mostrou vantajoso através de ensaios *in vitro* utilizando o *Oxygraph-2k*, principalmente por este equipamento ser otimizado para o uso de materiais em suspensão sob agitação constante e possibilitar a adição de vários substratos e inibidores durante o experimento.

A análise de mitocôndrias isoladas no *Seahorse XF* pode ser realizada utilizando-se pequenas quantidades de amostras (1 a 10 µg de proteína mitocondrial

por poço), mas estas organelas precisam ser previamente aderidas à placa (30, 33). Todos os parâmetros envolvendo as medidas mitocondriais podem ser obtidos através do uso de inibidores da cadeia respiratória e os valores obtidos de tais parâmetros podem ser comparados entre as amostras. No entanto, os resultados obtidos com o *Seahorse XF* podem variar entre as réplicas realizadas devido à distribuição das mitocôndrias nem sempre ser homogênea nos poços. Portanto, diluições do homogenato mitocondrial são necessárias para se obter resultados confiáveis (23).

Existem limitações quanto ao uso de mitocôndrias isoladas como material de estudo, uma vez que o processo de isolamento modifica a integridade das comunicações e processos que ocorrem entre organelas bem como processos citoplasmáticos, levando-se a obter dados diferentes em mitocôndrias isoladas e células intactas (34, 35). Além disso, o isolamento mitocondrial em tecidos considerados sem alguma patologia é realizado sob condições de centrifugação otimizadas que já foram demonstradas não danificar as membranas mitocondriais interna e externa, resultando, desta forma, em uma alta qualidade das mesmas. Porém diferentes patologias podem afetar a integridade das membranas mitocondriais e, portanto, a sensibilidade destas frente a uma centrifugação muda, podendo resultar em uma seleção de uma população mitocondrial que não corresponde à realidade (36). Outro fator para se obter um rendimento experimental ideal e qualidade da suspensão mitocondrial é a necessidade de uma grande quantidade de tecido ou células. Essas limitações afetam igualmente os dados coletados tanto no *Oxygraph-2k* como no *Seahorse XF* (23).

#### **1.4.2. Cultura de Células Intactas**

As taxas respiratórias determinadas em células intactas variam consideravelmente em comparação com mitocôndrias isoladas. Um bom exemplo é a medida do *estado respiratório 3* obtido em mitocôndrias isoladas quando é adicionado ADP, não sendo possível essa medida em células intactas uma vez que o ADP não atravessa a membrana plasmática (23, 37).

No entanto, outros parâmetros podem ser obtidos com células intactas como respiração basal, fração da respiração acoplada a síntese de ATP, eficiência

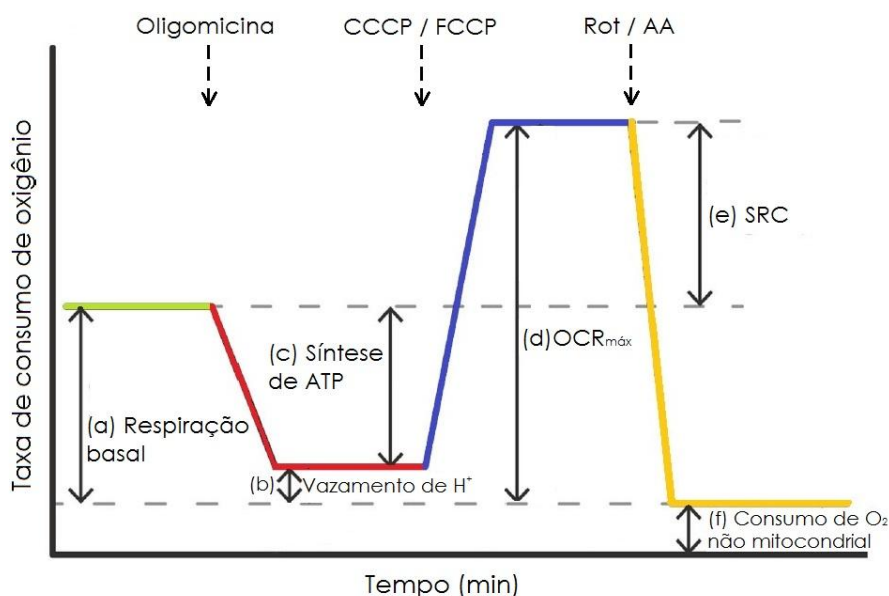


de acoplamento, vazamento de prótons pelos complexos respiratórios, respiração máxima, reserva ou capacidade respiratória, taxa do controle respiratório e o consumo de oxigênio não vinculado à respiração mitocondrial. Todos estes parâmetros podem ser determinados direta ou indiretamente pela análise dos efeitos da adição de inibidores mitocondriais e do protonóforo CCCP (ou FCCP), conforme apresentado na **Figura 5** (4, 23, 24).

O consumo de oxigênio não vinculado à respiração mitocondrial (**Figura 5 → f**) é dado pela ação de enzimas que consomem oxigênio em suas reações, como a NADPH oxidase, e corresponde geralmente a menos que 15% da respiração máxima. Para se estimar o consumo de oxigênio não mitocondrial, ao final de cada traçado experimental, adicionam-se inibidores específicos de complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons (p.ex. rotenona e antimicina A). Desta forma, a taxa de consumo de oxigênio não-mitocondrial é obtida e pode ser subtraída dos demais parâmetros (1, 4, 14, 24, 28, 32).

A respiração basal (**Figura 5 → a**) é controlada principalmente pela fosforilação do ADP em ATP (fluxo de prótons através da ATP sintase) e parcialmente pela oxidação de substratos e vazamento de prótons pela membrana mitocondrial (1, 4, 25). Diferenças no consumo basal de  $O_2$  em uma mesma linhagem celular podem sugerir um consumo ou síntese alterada de ATP, alterações na oxidação de substratos respiratórios, no transporte de nucleotídeos de adenina (via ANT) ou de fosfato (4).

A inibição da ATP sintase com oligomicina permite a determinação da fração da respiração acoplada à síntese de ATP. Essa taxa é calculada pela diferença da respiração basal e da respiração obtida na presença deste inibidor (**Figura 5 → c = a-b**) (24, 28).



**Figura 5:** Esquema de protocolo experimental padrão para se avaliar a função mitocondrial em células intactas, medindo-se a taxa do consumo de oxigênio mediante a adição sequencial de inibidores mitocondriais e do protonóforo CCCP (ou FCCP) (Adaptado de ref. 4).

Após a adição de oligomicina, o consumo restante de O<sub>2</sub> mitocondrial é predominantemente controlado pelo vazamento de prótons através da membrana interna e, em menor extensão, pela oxidação de substratos (**Figura 5 → b**) (4, 24, 28). Como o vazamento de prótons em si está relacionado com o potencial de membrana mitocondrial e a oligomicina geralmente hiperpolariza as mitocôndrias, essa medida tende a subestimar a contribuição da fosforilação do ADP à ATP e superestimar o vazamento de prótons (4, 28, 32). Um grande aumento no vazamento de prótons pode significar que as mitocôndrias estão danificadas ou que há uma mudança em seu potencial de membrana, como a promovida por proteínas desacopladoras (UCP) (1, 6).

Outro parâmetro que pode ser obtido é a taxa de eficiência de acoplamento, calculada pela taxa de respiração sensível à oligomicina dividida pela respiração basal (**Figura 5 → c/a**). Este parâmetro está intimamente relacionado com a demanda de ATP celular. Trata-se de um índice interessante por refletir os demais e ser constituído por uma razão normalizada internamente, o que pode compensar variações na densidade celular ou na resposta do equipamento (1).

Outro fator a que se deve atenção quando a oligomicina é utilizada é que toda a produção celular de ATP é obtida através da glicólise. Esta via pode ser

aumentada em até 10 vezes para manter os níveis de ATP (38, 39). Embora a maioria das células tenha capacidade glicolítica suficiente, algumas não suportam essa mudança por não possuírem reserva glicolítica, como o observado para células  $\beta$  pancreáticas (40).

Para o cálculo da respiração máxima ( $OCR_{max}$ ) (**Figura 5 → d**) deve-se titular um desacoplador como o CCCP ou FCCP, adicionando apenas o suficiente para estimular o máximo a cadeia transportadora de elétrons, mas evitando a dissipação total do potencial de membrana mitocondrial. Os desacopladores agem como protonóforos, criando um circuito de prótons através da membrana mitocondrial interna, diminuindo assim a força próton motriz transmembrana, permitindo que a respiração aumente (4, 14, 24, 28). Neste estado, a oxidação do substrato é o que controla predominantemente o consumo de  $O_2$ . Esta é considerada a capacidade respiratória máxima, embora essa medida dependa criticamente da concentração do desacoplador. O excesso de desacoplador pode inibir a respiração por colabar a força próton motriz, interrompendo os processos de transporte facilitados pelo potencial de membrana mitocondrial, como por exemplo, o transporte de alguns substratos como malato e glutamato (1, 28, 41-43). A densidade celular e a composição do meio também podem afetar a concentração do desacoplador necessária para induzir a respiração máxima (a albumina, por exemplo, pode se ligar ao desacoplador diminuindo sua eficiência). Alterações na capacidade respiratória máxima podem indicar disfunção nos complexos respiratórios, ou na captação e suprimento de substratos (4).

Quando subtraímos a respiração máxima da respiração basal, obtemos a capacidade de reserva respiratória (SRC) (**Figura 5 → e = d-a**). É um valor que retrata a capacidade de suprimento de substratos e da transferência de elétrons para responder a um aumento na demanda energética celular e tem a vantagem de indicar quão próximo do seu limite bioenergético uma célula está operando (1, 4, 24, 25, 28).

Um último parâmetro que pode ser avaliado em células intactas é a taxa de controle respiratório, sendo calculada pela razão entre a respiração máxima e o vazamento de prótons (**Figura 5 → d/b**). Esse parâmetro é sensível a mudanças na oxidação de substratos e no vazamento de prótons, mas não está relacionado à fosforilação do ADP à ATP (1, 4).

A avaliação da atividade mitocondrial em suspensão de células intactas em tempo real é realizada geralmente utilizando-se o *Oxygraph-2k*. As células em suspensão, para o experimento, podem estar em um meio de cultura que forneça os substratos respiratórios. Alternativamente, estas células podem ser incubadas em um meio pobre em nutrientes forçando-as a utilizarem seus substratos endógenos para promoverem sua respiração. Já o *Seahorse XF* é capaz de medir o metabolismo mitocondrial celular em tempo real sendo capaz de analisar tanto cultura de células aderidas e, em alguns casos, células em suspensão (no entanto, as células que se proliferam em suspensão precisam passar por uma etapa em que são fixadas ao fundo da placa antes da análise). Para essa análise, as células devem ser cultivadas a uma confluência de 70% a 80% (23).

Tratando-se das desvantagens de células intactas como modelo de estudo, embora estas mantenham a arquitetura intracelular preservada e sejam fisiologicamente relevantes para a análise da bioenergética mitocondrial, existem, no entanto, vários problemas associados com a construção e manutenção de linhagens celulares (23). No que se refere aos problemas de manutenção, pode-se relacionar a contaminação por bactérias, micoplasma e mesmo a contaminação com outras linhagens celulares (44). Já no que se trata à geração de linhagens imortalizadas, pode ocorrer perda de algumas funções celulares, elevadas taxas glicolíticas e, conseqüentemente, uma respiração mitocondrial reduzida (23). Além disso, células intactas não permitem o estudo de certos parâmetros funcionais quando comparadas a mitocôndrias isoladas, como a resposta a alguns substratos respiratórios e ao ADP (23, 25, 37).

Uma abordagem também utilizada é o emprego de células permeabilizadas, onde é possível a aplicação de protocolos similares aos que são empregados a mitocôndrias isoladas. A permeabilização da membrana plasmática celular pode ser realizada por diversas abordagens, incluindo eletroporação ou adição de concentrações previamente tituladas de glicosídeos esteróides anfipáticos (digitonina ou saponina) ou citolisinas bacterianas. A eletroporação cria poros pequenos e temporários e permite que apenas solutos com pequena massa molecular (por exemplo, íons e nucleotídeos) atravessem a membrana. Em contraste, a digitonina, a saponina e um subconjunto de citolisinas criam poros

grandes e permanentes em locais contendo colesterol na membrana, permitindo a passagem de moléculas com até 200 kDa (2, 26, 28).

Os compostos saponina ou digitonina têm sido largamente empregados para se obter a permeabilização da membrana plasmática, onde estes compostos interagem especificamente com as moléculas de colesterol nela inseridas, resultando na formação de poros que permitem a entrada de reagentes que até então não penetravam a célula. Como a membrana plasmática celular possui consideravelmente mais colesterol que a membrana de outras organelas, estes agentes permeabilizantes não afetam significativamente outras organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Dessa forma, o uso de saponina ou digitonina mantém intactas muitas das interações intracelulares entre proteínas e membranas, particularmente as membranas associadas às mitocôndrias que estão envolvidas na sinalização intracelular de cálcio, como as interações entre o retículo endoplasmático e mitocôndria (1, 2, 23, 25, 37).

Essa abordagem tem demonstrado ser fisiologicamente relevante, pois permite a análise das mitocôndrias em seus níveis de interações intracelulares (1, 23). E quando comparada com o isolamento de mitocôndrias, há uma diminuição dos problemas associados com o tempo de preparo da amostra e da perda geral ou seletiva destas organelas e dos danos causados a elas (1, 14). No entanto, o impacto dos fatores citosólicos não pode ser estudado, porque quando há a permeabilização celular o citosol e todos os componentes solúveis celulares são perdidos. Isso é particularmente importante porque a função mitocondrial normal requer uma comunicação com os componentes citosólicos para manter a homeostase celular (23).

#### **1.4.3. Tecidos**

Uma estratégia para superar as limitações encontradas tanto em isolamentos mitocondriais como em linhagens de células cultivadas é estudar a função mitocondrial usando abordagens *in situ*, ou seja, utilizando amostras de tecidos permeabilizados. A permeabilização do tecido se procede da mesma maneira que em células, utilizando agentes permeabilizantes como a saponina e digitonina (13, 23). A grande vantagem do uso de tecidos (ou biopsias) é a

possibilidade da análise da função mitocondrial em amostras bastante reduzidas. Além disso, este tipo de amostra requer um tempo curto de preparo, constituído basicamente do tempo de sua obtenção e da etapa de permeabilização.

Entre as desvantagens deste tipo de amostra, além das já citadas para células permeabilizadas, uma das principais é que em um tecido se encontram múltiplos tipos celulares e, com a permeabilização, os parâmetros respiratórios de diferentes subpopulações mitocondriais não podem ser distinguidos. Além disso o tecido em análise não poderá interagir com os tecidos adjacentes, não podendo ser analisada, dessa forma, a influência do organismo como um todo nos parâmetros funcionais mitocondriais (23, 37).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros metodológicos para o estudo da cadeia transportadora de elétrons por meio do consumo de oxigênio em linhagens de células tumorais intactas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Reportar e caracterizar o efeito inibitório ocasionado pela utilização de oligomicina (inibidor da ATP sintase) na determinação da capacidade respiratória máxima e, conseqüentemente, da capacidade de reserva respiratória em células tumorais.
- Elucidar o mecanismo envolvido na inibição pela oligomicina da capacidade respiratória máxima e da capacidade de reserva respiratória.
- Desenvolver um protocolo experimental alternativo que permitisse o uso de inibidores da ATP sintase, sem que houvesse a subestimação da capacidade respiratória máxima e da capacidade da reserva respiratória.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Capítulo I

**Ruas JS**, Siqueira-Santos ES, Amigo I, Rodrigues-Silva E, Kowaltowski AJ, Castilho RF.

“Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells”.

**PLoS One**, 11(3): e0150967, 2016.\*

\*Os experimentos de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos foram realizados em sua totalidade pela co-autora Edilene S. Siqueira-Santos.



## RESEARCH ARTICLE

# Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells

Juliana S. Ruas<sup>1</sup>, Edilene S. Siqueira-Santos<sup>1</sup>, Ignacio Amigo<sup>2</sup>, Erika Rodrigues-Silva<sup>1</sup>, Alicia J. Kowaltowski<sup>2</sup>, Roger F. Castilho<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

\* [roger@fcm.unicamp.br](mailto:roger@fcm.unicamp.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Ruas JS, Siqueira-Santos ES, Amigo I, Rodrigues-Silva E, Kowaltowski AJ, Castilho RF (2016) Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells. PLoS ONE 11(3): e0150967. doi:10.1371/journal.pone.0150967

**Editor:** Salvatore V Pizzo, Duke University Medical Center, UNITED STATES

**Received:** December 1, 2015

**Accepted:** February 22, 2016

**Published:** March 7, 2016

**Copyright:** © 2016 Ruas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP, #11/50400-0, #10/51906-1 and #13/07937-8) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). JSR and ER-S are recipients of CAPES fellowships and IA is recipient of a FAPESP (#12/51288-1) fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The maximal capacity of the mitochondrial electron transport system (ETS) in intact cells is frequently estimated by promoting protonophore-induced maximal oxygen consumption preceded by inhibition of oxidative phosphorylation by oligomycin. In the present study, human glioma (T98G and U-87MG) and prostate cancer (PC-3) cells were titrated with different concentrations of the protonophore CCCP to induce maximal oxygen consumption rate (OCR) within respirometers in a conventional growth medium. The results demonstrate that the presence of oligomycin or its A-isomer leads to underestimation of maximal ETS capacity. In the presence of oligomycin, the spare respiratory capacity (SRC), i.e., the difference between the maximal and basal cellular OCR, was underestimated by 25 to 45%. The inhibitory effect of oligomycin on SRC was more pronounced in T98G cells and was observed in both suspended and attached cells. Underestimation of SRC also occurred when oxidative phosphorylation was fully inhibited by the ATP synthase inhibitor citreoviridin. Further experiments indicated that oligomycin cannot be replaced by the adenine nucleotide translocase inhibitors bongkreikic acid or carboxyatractyloside because, although these compounds have effects in permeabilized cells, they do not inhibit oxidative phosphorylation in intact cells. We replaced CCCP by FCCP, another potent protonophore and similar results were observed. Lower maximal OCR and SRC values were obtained with the weaker protonophore 2,4-dinitrophenol, and these parameters were not affected by the presence of oligomycin. In permeabilized cells or isolated brain mitochondria incubated with respiratory substrates, only a minor inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR was observed. We conclude that unless a previously validated protocol is employed, maximal ETS capacity in intact cells should be estimated without oligomycin. The inhibitory effect of an ATP synthase blocker on potent protonophore-induced maximal OCR may be associated with impaired metabolism of mitochondrial respiratory substrates.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Oxygen consumption rate (OCR) measurements are one of the preferred methods for mitochondrial function or dysfunction evaluation in cultured cells (for reviews see [1], [2]). When the plasma membrane is permeabilized or isolated mitochondria are studied, the respiratory control ratio can be assessed in a medium supplemented with respiratory substrates by measuring the increase in OCR after the addition of ADP. When using intact cells, specific respirometric protocols are usually employed to evaluate mitochondrial function and can provide valuable information such as that described below. The fraction of basal OCR (or ROUTINE respiration, as it is referred to in [2]) inhibited by addition of the ATP synthase inhibitor oligomycin gives an estimate of the respiration rate necessary to sustain cellular ATP turnover under basal conditions. The respiration remaining in the presence of oligomycin is linked to the proton leak rate across the mitochondrial membrane and to other processes such as reactive oxygen species formation and energy-driven ion/metabolite transport. Maximal capacity of the mitochondrial electron transport system (ETS) can be estimated by inducing maximal OCR via chemical dissipation of the mitochondrial membrane potential, generally by the addition of a potent protonophore such as CCCP or FCCP. However, assessment of this maximal OCR usually requires caution (to avoid underestimating the results and drawing incorrect conclusions) as well as titration of the protonophore [1, 2]. The presence of oligomycin during the estimation of maximal OCR is widespread in such assays and it seems to be important to prevent the reverse activity of ATP synthase with rapid intracellular ATP depletion, which may lead to cellular metabolic dysfunction and death. Spare respiratory capacity (SRC) is given by the difference between maximal OCR and basal respiration and is an estimative of the cell's ability to cope with large increases in ATP turnover. Finally, the addition of a potent respiratory chain inhibitor, such as antimycin A, allows non-mitochondrial OCR to be estimated.

Mitochondrial energy metabolism seems to play specific roles in the biology of tumor cells [3–6]. Although mutations in citric acid cycle enzymes are associated with tumor formation [7, 8], most tumor cells present normal mitochondrial integrity and oxidative phosphorylation capacity [9–11]. Recently, two groups showed that mitochondrial respiration is essential for tumor cell proliferation since it promotes aspartate biosynthesis [12, 13]. Further assessment of mitochondrial function in tumor cells may contribute to a better understanding of the role of these organelles in tumorigenesis and to the development of effective new cancer therapies [11, 14, 15]. In this study we investigated the effect of ATP synthase inhibitors on maximum OCR measured in tumor cells in order to understand our experimental evidences of an undesirable inhibitory effect of the ATP synthase inhibitor oligomycin on maximal OCR obtained in studies evaluating mitochondrial function in glioma cell lines. The data presented here indicate that the presence of oligomycin significantly underestimates CCCP- or FCCP-induced maximal OCR and SRC. Moreover, alternative compounds and protocols to assess maximal OCR in cells with inhibited oxidative phosphorylation were evaluated.

## Materials and Methods

### Chemicals and Cell Lines

Most of the chemicals used, including adenosine diphosphate (ADP; A2754), bongkreikic acid (BKA; B6179), carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP; C2759), carboxyatractyloside (CAT; C4992), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP; C2920), digitonin (D141), dimethyl sulfoxide (DMSO; D8418), 2,4-dinitrophenol (DNP; D198501), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES; H3375), oligomycin (oligo; O4876), oligomycin A (oligo A; 75351) and sodium pyruvate (P4562) were obtained from

Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Oligomycin (oligo\*; item number 11341) was also obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), as was citreoviridin (citre; item number 11319). CCCP, citreoviridin, DNP, FCCP, oligomycin and oligomycin A stock solutions were prepared by dissolving the respective chemicals in DMSO. ADP and HEPES solutions were prepared in ultrapure (Type I) water, and their pH adjusted to 7.2 with NaOH. Carboxyatractyloside was dissolved in Type I water. The cocktail of NADH-linked respiratory substrates containing glutamate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate and pyruvate was prepared by dissolving the respective acids in water and adjusting the pH to 7.2 with KOH.

Cell lines T98G and U-87MG were derived from human glioblastoma, while PC-3 was derived from a prostate cancer bone metastasis. All three cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). Antibiotics (penicillin and streptomycin); Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 2 g/L of glucose; fetal bovine serum (FBS); phosphate buffered saline (PBS); and trypsin/EDTA solution (0.25%) were purchased from Vitrocell (Campinas, SP, Brazil).

## Cell Cultures

PC-3, T98G and U-87MG cells were maintained continuously at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere in 175 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks and DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Because the doubling times of these cells are between 24 and 36 h, the cells were seeded every two or three days (approximately 25,000 cells/cm<sup>2</sup>) into new culture flasks and fresh medium. Briefly, the adhered cells were pre-washed with PBS and then incubated for 2–4 min with a trypsin/EDTA solution (0.25%) at 37°C to dissociate the cells from the flask surface. Trypsin was inactivated by adding supplemented DMEM to the flask. Passage of the cells into new flasks and fresh medium was performed after centrifuging the cell suspension at 400 g for 5 min and suspending the resulting pellet in supplemented DMEM. The experiments were conducted when the cells were between the 3<sup>rd</sup> and 16<sup>th</sup> passages.

For experiments with suspended cells, these were plated on 150 cm<sup>2</sup> culture dishes at an initial density of 15–20,000 cells/cm<sup>2</sup> and maintained for 3 or 4 days. On the day of the experiments, trypsin-dissociated cells were centrifuged at 400 g for 5 min and suspended in DMEM containing 20 mM HEPES-Na<sup>+</sup> at a density of 24–32 x 10<sup>6</sup>/mL (>95% viability). Cell suspensions were kept at room temperature and used within 2.5 hours.

For the experiments with attached cells, T98G cells were seeded in Seahorse XF24 V7 cell culture microplates at a density of 40–50,000 cells/well in supplemented DMEM. After 24 h, the medium was replaced by supplemented DMEM containing 20 mM HEPES-Na<sup>+</sup> and left for 1 h in a CO<sub>2</sub> incubator to allow the cells to stabilize before the experiment.

## Isolation of rat forebrain mitochondria

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were obtained from the State University of Campinas (UNICAMP) Animal Breeding Center. Six rats were used for the present study and were euthanized by decapitation [16]. Rat brain mitochondria were isolated as described by Michelini et al. [17] using digitonin to permeabilize the synaptosomal plasma membrane [18]. The use of a similar procedure to isolate mitochondria from intact cultured glioma cells did not result in functional mitochondria in sufficient quantity to conduct experiments (data not shown). All procedures involving animal handling were approved by the Ethics Committee of Universidade Estadual de Campinas (protocol number CEUA 2534–1) and are in accordance with the Brazilian National Guide.

## Oxygen uptake measurements in suspended tumor cells and isolated rat brain mitochondria

The OCR in suspended intact cells and isolated rat brain mitochondria was measured using a high-resolution respirometer (OROBOROS Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria) with DatLab 4 software for data acquisition and analysis. In intact tumor cells it was measured by incubating the cells ( $3\text{--}4 \times 10^6$ ) at  $37^\circ\text{C}$  in a 2 mL chamber containing supplemented DMEM and 20 mM HEPES- $\text{Na}^+$ . The pH of the medium at the beginning of the experiments was between 7.30 and 7.45.

The OCR in permeabilized cells and isolated rat brain mitochondria was measured by incubating the cells ( $3\text{--}4 \times 10^6$ ) or mitochondria (0.6 mg) at  $37^\circ\text{C}$  in a 2 mL chamber containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES- $\text{K}^+$  pH 7.2, 2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA and a cocktail of respiratory substrates ( $\alpha$ -ketoglutarate, malate, glutamate and pyruvate; 5 mM of each). Digitonin (30  $\mu\text{M}$ ) was also present in the reaction medium for the experiments with permeabilized cells.

Before each experiment, the oxygen concentration in the medium was equilibrated for 2–3 min with air in the respirometer chambers at  $37^\circ\text{C}$  until a stable signal was obtained at an oxygen concentration of approximately 195  $\mu\text{M}$ . Cell suspensions or isolated rat brain mitochondria were then added to a final volume of 2 mL, and the chambers were closed by inserting the stoppers. The cell suspensions were constantly stirred (750 rpm) inside the chambers, and the chemicals were added through the titanium injection port of the stoppers using Hamilton syringes. All measurements were carried out when oxygen concentration was above 30  $\mu\text{M}$  in the reaction medium. OCR was calculated as the negative time derivative of oxygen concentration measured in the closed respirometer chambers and expressed per million of cells or per mg of isolated mitochondria. Data were recorded at 2 s intervals, and 10 data points were used to calculate the slope of the OCR plot through a polynomial fit with DatLab 4 software [2].

## Oxygen uptake measurements in attached T98G cells

Oxygen consumption in attached T98G cells was measured using a Seahorse XF24 Analyzer. Initially, 300  $\mu\text{L}$  of supplemented DMEM containing 20 mM HEPES- $\text{Na}^+$  was placed in each well, and each addition consisted of 75  $\mu\text{L}$ , resulting in a final volume of 600  $\mu\text{L}$ . The first injector was loaded with either medium plus oligomycin or medium containing the corresponding volume of DMSO. After the first addition, the oligomycin concentration in the wells was 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The second injector was loaded with CCCP to achieve a concentration of 4  $\mu\text{M}$  in the wells, while the other two injectors were loaded with CCCP to achieve concentrations of 5.4 and 6.8  $\mu\text{M}$ . Four time points were measured before the first injection (basal respiration), three after the oligomycin/DMSO addition and two after each CCCP addition. At the end of each experiment, the cells were washed twice with PBS and their total protein content determined by the Bradford method in each well to normalize the OCR values. Data points for each condition were pooled and calculated as the percentage change from basal respiration.

## Statistical analysis

Results are presented as representative traces or as means  $\pm$  standard errors (SEM). Each experimental protocol was conducted at least in duplicate, with a minimum of four different cell culture passages or mitochondrial preparations. Since the measurements were always made with matched samples, i.e., control and treated conditions, two-tailed paired Student's *t*-test was used to compare two different groups. Repeated-measures one-way ANOVA followed by the post hoc Bonferroni test was used when multiple comparisons were performed. Differences

between the concentrations of CCCP and FCCP to reach maximal OCR were assessed by the Mann-Whitney test. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . The data were analyzed using GraphPad Prism 5 software.

## Results

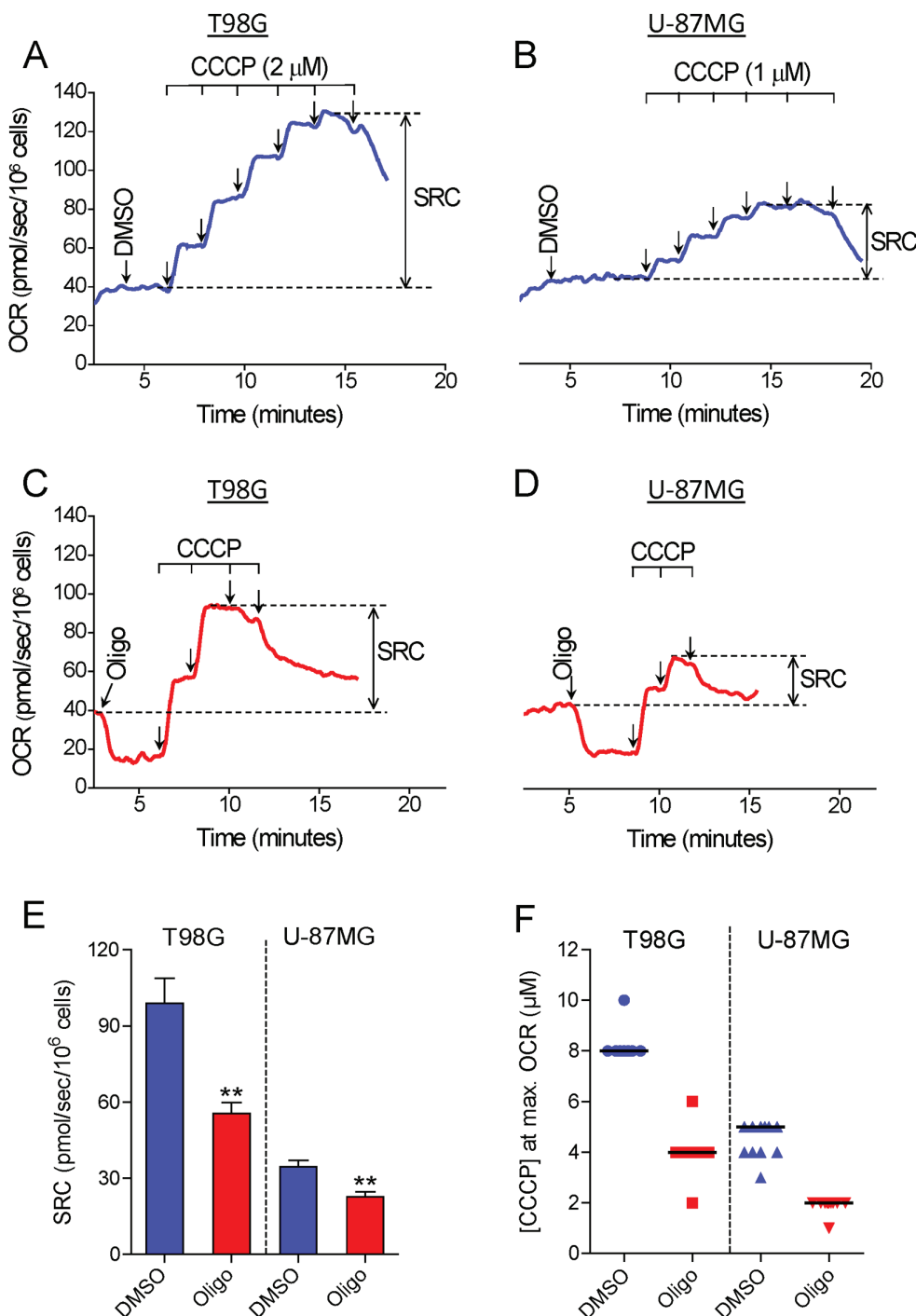
### The inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR in suspended tumor cells

[Fig 1](#) shows the results of experiments conducted to determine the maximal OCR in suspended intact glioma cells. T98G and U-87MG cells were incubated in HEPES-buffered, FBS-supplemented (10%) DMEM. This medium contains 11 mM glucose, 4 mM glutamine and 1.25 mM pyruvate as major oxidative substrates. The purpose in choosing this incubation medium was to simulate similar conditions to those in the cell culture. First, maximal OCR was determined by titration with the protonophore CCCP. In most of the experiments, T98G and U-87MG cells reached maximal OCR in the presence of 8 and 4–5  $\mu$ M CCCP, respectively ([Fig 1A, 1B and 1F](#)). Remarkably, when a standard experimental protocol to determine maximal OCR consisting of CCCP titration preceded by oligomycin-inhibited oxidative phosphorylation was used, a lower maximal OCR was observed for both glioma cells ([Fig 1C and 1D](#)). In most of the experiments with T98G and U-87MG cells previously treated with oligomycin, maximal OCR was obtained after the addition of 4 and 2  $\mu$ M CCCP, respectively ([Fig 1F](#)). SRC, i.e., the difference between maximal and basal OCR, was underestimated by  $42.8 \pm 2.7\%$  and  $34.3 \pm 2.8\%$  in oligomycin-treated T98G and U-87MG cells, respectively, compared with cells treated only with the DMSO vehicle before CCCP titration ([Fig 1E](#)). As previously reported for isolated mitochondria and intact cells [2, 19–21], inhibition of OCR was observed in our experiments when supraoptimal concentrations of CCCP were present. This undesired effect of high concentrations of CCCP on OCR may be related to an excess of this compound in the mitochondrial membrane, leading to inhibition of respiratory activity [19], and/or due to a decline in the supply of respiratory substrates to mitochondria [1]. The concentrations of CCCP necessary to reach maximal OCR varied during our study. This may be related to the binding of CCCP to components of the different batches of FBS. In addition, we observed that this variation was minimized by avoiding repeated freezing and thawing of the aliquots of CCCP solution. Despite this variation, the concentration of CCCP required to reach maximal OCR in oligomycin-treated cells was always approximately half that required when only DMSO (the oligomycin solvent) was present.

To evaluate whether the inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR would also be observed with a different cell line, we conducted experiments with PC-3 cells, derived from prostatic adenocarcinoma. [S1 File](#) shows that compared with the value for PC-3 cells treated with DMSO, SRC was underestimated by  $26.3 \pm 3.6\%$  in PC-3 cells treated with oligomycin.

Most of the next experiments used T98G cells, since they showed greater sensitivity to the inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR. Experiments were conducted to determine whether the inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR would be observed with a single addition of the optimal concentration of CCCP ([S2 File](#)). CCCP titration or a single addition of the optimal concentration of CCCP resulted in similar maximal OCRs for T98G cells ([S2A and S2B File](#)). However, when the optimal concentration of CCCP was added to T98G cells previously treated with oligomycin, a lower maximal OCR was observed and was followed by progressive inhibition of oxygen consumption ([S2C File](#)).

We also investigated whether the addition of oligomycin would have an inhibitory effect on the OCR of cells already stimulated by CCCP. A suboptimal concentration of CCCP was used



**Fig 1. Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal oxygen consumption in intact human glioma cells.** **A** and **C**: Representative oxygen consumption rate (OCR) traces in suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6$ /mL). Where indicated by the arrows,  $1 \mu\text{g/mL}$  oligomycin (Oligo) and DMSO ( $0.5 \mu\text{L}$  of each) were added, followed by sequential additions of CCCP ( $2 \mu\text{M}$  each). **B** and **D**: Representative traces of OCR in suspended U-87MG cells ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL). Where indicated by the arrows,  $1 \mu\text{g/mL}$  oligomycin and  $0.5 \mu\text{L}$  DMSO were added followed by sequential additions of CCCP ( $1 \mu\text{M}$  each). SRC was estimated as the difference between maximal and basal OCR, as shown in the representative traces. **E**: SRC values for T98G and U-87MG cells obtained in the presence and absence of oligomycin. \*\*Statistically significant difference from the result for the respective control (DMSO),  $P < 0.01$ . **F**: Values of CCCP concentrations required to achieve maximal OCR in T98G and U-87MG cells in the presence and absence of oligomycin.

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g001



to avoid any delayed inhibitory effect of this compound on OCR during the experiment ([Fig 2A](#)). The results indicated that the addition of oligomycin at a concentration high enough to inhibit oxygen consumption by oxidative phosphorylation, i.e., 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ([Fig 2C](#)), results in remarkable inhibition of CCCP-stimulated OCR for T98G cells ([Fig 2B](#)).

### The inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR in attached T98G cells

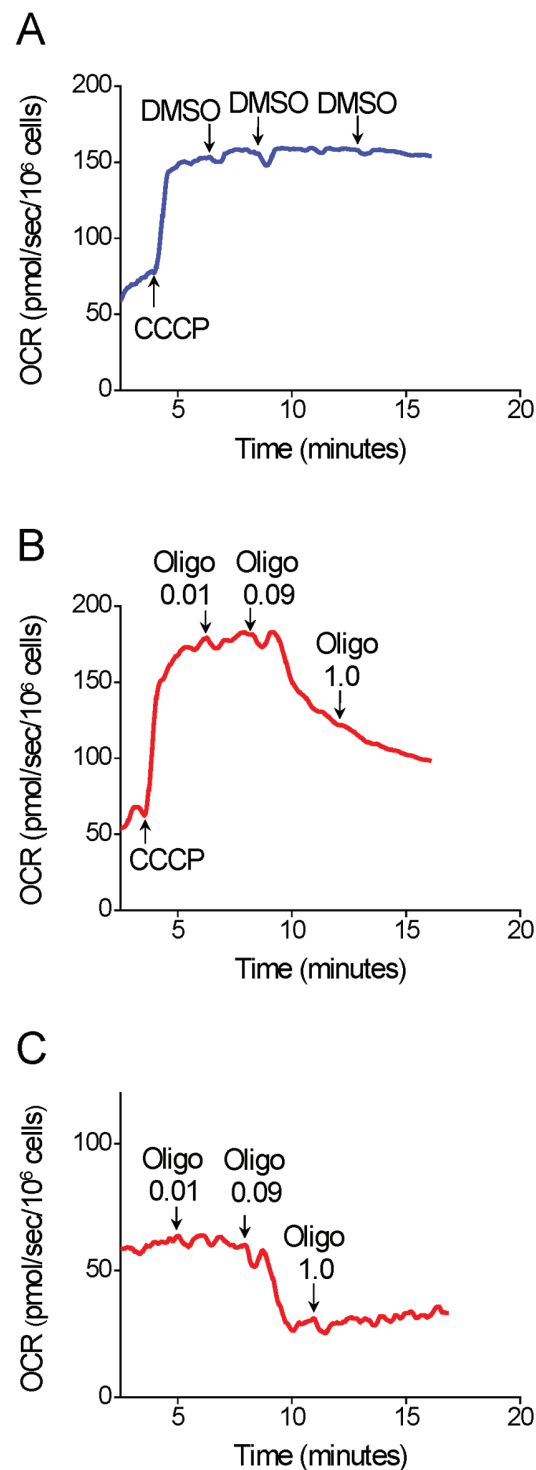
[Fig 3](#) shows measurements of OCR in attached T98G cells. Maximal OCR was achieved by adding CCCP three consecutive times to give final protonophore concentrations of 4, 5.4 and 6.8  $\mu\text{M}$ , respectively. Higher CCCP concentrations, e.g., 7.1 or 8.3  $\mu\text{M}$  were not used because pilot experiments indicated that these did not result in further increases in OCR (results not shown). Like suspended T98G cells, attached T98G cells showed lower OCR and SRC when CCCP titration was preceded by addition of oligomycin ([Fig 3A](#)). In this case, maximal OCR was reached with 4  $\mu\text{M}$  CCCP, while when only DMSO was added the corresponding figure was 6.8  $\mu\text{M}$  CCCP ([Fig 3B](#)). Compared with the value for T98G cells treated with DMSO, SRC was underestimated by  $43.7 \pm 2.3\%$  in T98G cells treated with oligomycin ([Fig 3B](#)).

### Evaluation of alternative protocols to estimate maximal OCR in intact tumor cells

In view of the preceding results indicating that oligomycin has an important inhibitory effect on CCCP-induced maximal OCR in intact tumor cells, the next experiments were conducted to test different experimental protocols for maximal OCR assessment in T98G with inhibited oxidative phosphorylation. First, oligomycin from a different supplier (referred to here as oligo\*) was tested. The effect of the A-isomer of oligomycin (oligo A) was also evaluated ([Fig 4](#)). The oligomycin complex is a mixture of oligomycins A, B and C, the first two being the most potent ATP synthase inhibitors [22]. The results in [Fig 4](#) show that oligo\* or oligo A had an inhibitory effect on SRC in T98G cells similar to that observed with oligomycin.

The effect of the ATP synthase inhibitor citreoviridin was also tested on CCCP-induced maximal OCR in T98G cells. Unlike oligomycin, which binds to the  $F_0$  subunit of ATP synthase [23, 24], citreoviridin targets the  $F_1$  subunit [24, 25]. [Fig 5A and 5B](#) shows that the addition of 5  $\mu\text{M}$  citreoviridin partially inhibits oxygen consumption under basal conditions, indicating inhibition of oxidative phosphorylation. Nevertheless, sequential addition of oligomycin still resulted in further inhibition of oxygen consumption ([Fig 5A](#)). When a higher concentration of citreoviridin was used (20  $\mu\text{M}$ ), no further inhibitory effect was observed for oligomycin ([Fig 5B](#)). This 20  $\mu\text{M}$  concentration of citreoviridin was used for the next experiments. The results in [Fig 5C and 5D](#) show that, as with oligomycin (but to a lesser extent), when oxidative phosphorylation was fully inhibited by citreoviridin, CCCP-induced maximal OCR was underestimated. In the presence of citreoviridin, SRC was underestimated by  $26.4 \pm 6.5\%$  compared with DMSO-treated T98G cells.

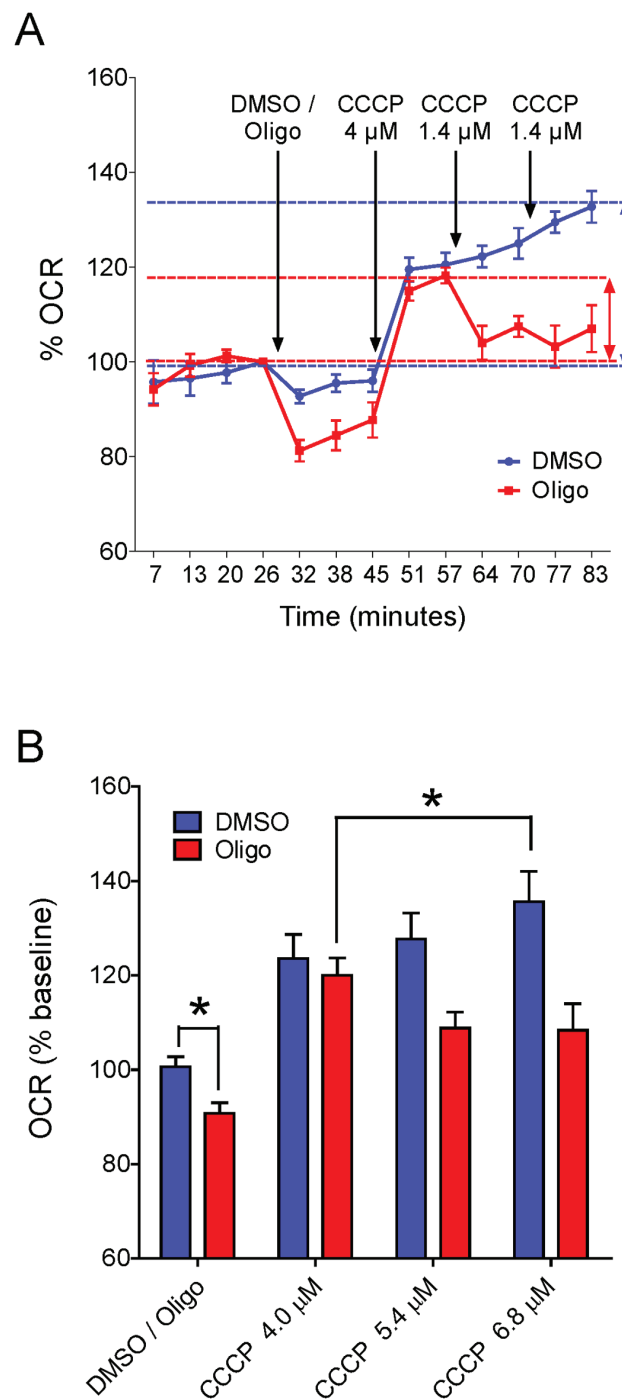
A different approach for the inhibition of oxidative phosphorylation in intact T98G cells was tested by using the adenine nucleotide translocator (ANT) inhibitors bongkreikic acid (BKA) and carboxyatractyloside (CAT) [26, 27]. [Fig 6](#) shows the results with intact and permeabilized T98G cells. The additions of BKA or CAT (25  $\mu\text{M}$  of each, **A, C**) to intact cells had no effect on basal oxygen consumption, indicating that these compounds do not inhibit oxidative phosphorylation in intact glioma cells. As expected, the sequential addition of oligomycin resulted in significant inhibition of oxygen consumption. Experiments with digitonin-permeabilized T98G cells indicated that BKA and CAT (2.5  $\mu\text{M}$  of each, **B, D**) were effective in fully inhibiting ADP-stimulated oxygen consumption.



**Fig 2. Inhibitory effect of oligomycin addition on CCCP-induced maximal OCR in T98G cells. A–C:** Representative OCR traces in suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL). Where indicated by the arrows, 5  $\mu$ M CCCP and 0.5  $\mu$ L of oligomycin (Oligo; 0.01, 0.09 and 1.0  $\mu$ g/mL) or DMSO were added.

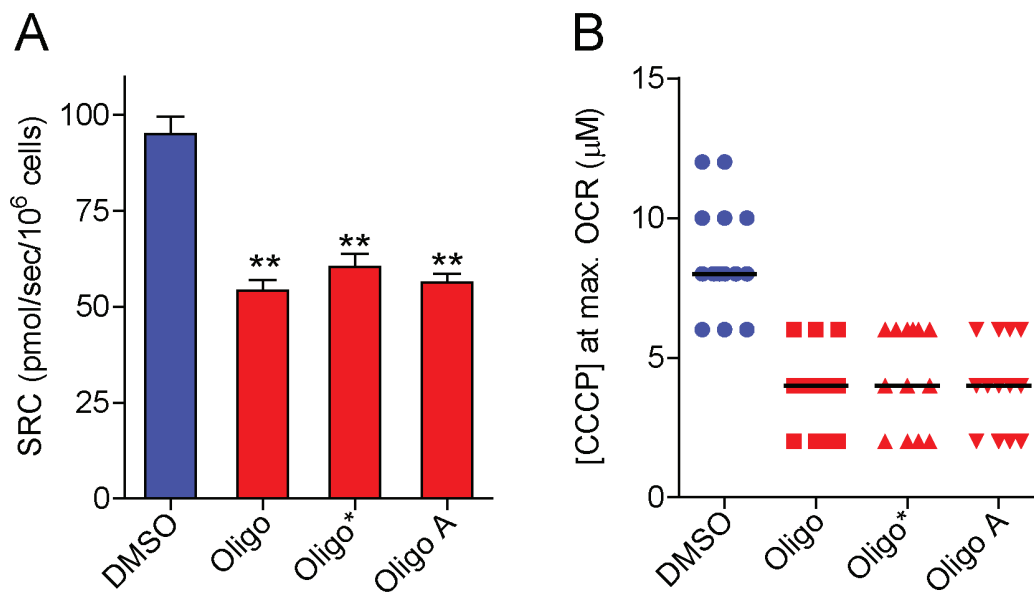
doi:10.1371/journal.pone.0150967.g002





**Fig 3. Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR in attached T98G cells. A:** Representative experiment to determine OCR in attached T98G cells. Arrows indicate additions of reagents and their concentrations. Results are shown as percentages in relation to the last point before the first addition. SRC (i.e., the difference between maximal respiratory rate and basal respiration) for each condition is indicated by vertical coloured arrows. **B:** Quantification of OCR with respect to basal respiration in cells treated with DMSO or oligomycin. Maximal respiratory rates with CCCP were smaller in oligomycin-treated cells and occurred at lower CCCP concentrations. \*Statistically significant difference from the result for DMSO,  $P < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g003



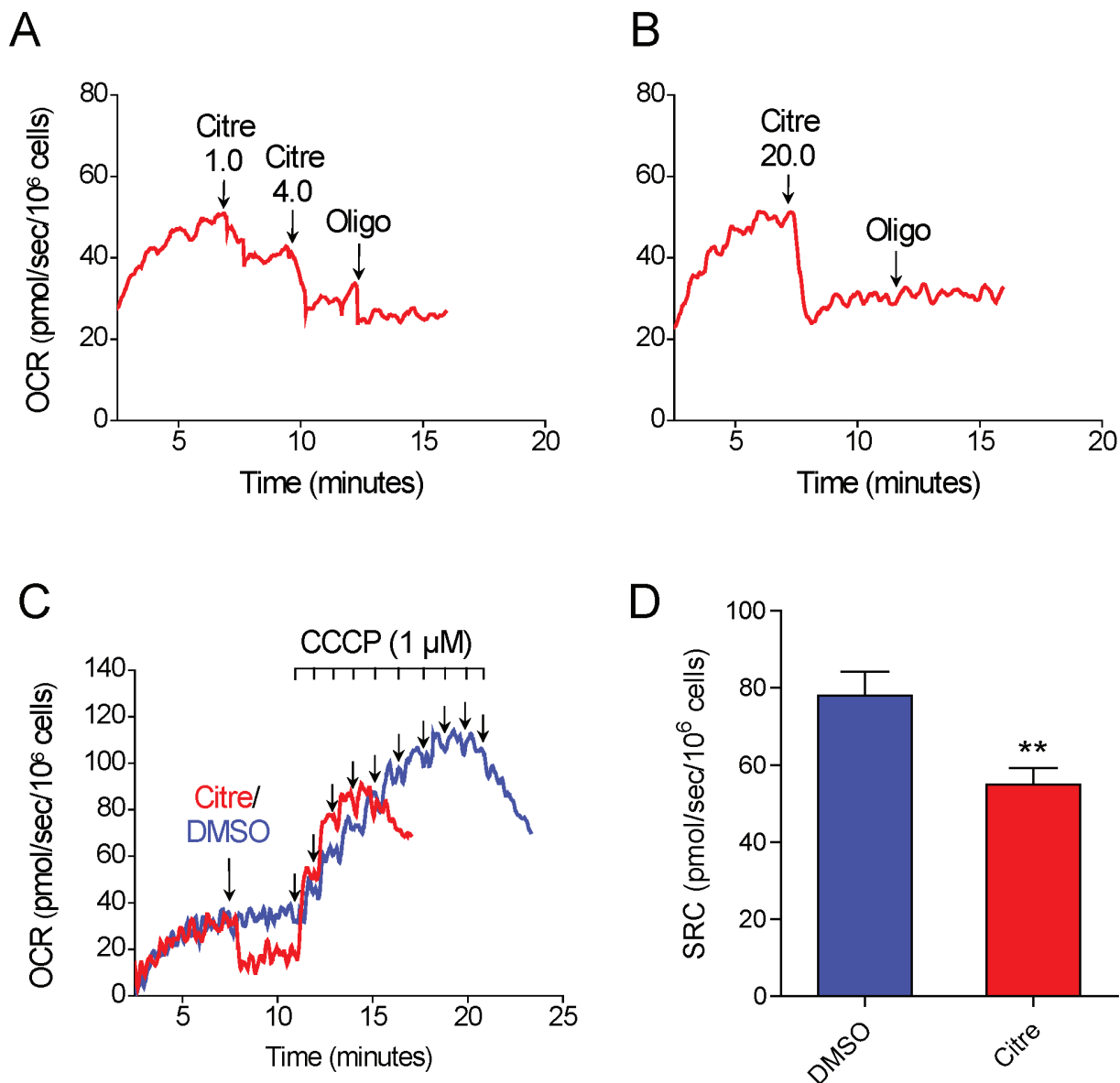
**Fig 4. Inhibitory effect of oligomycin and its A-isomer on SRC for T98G cells.** After incubation of T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) for 3–5 min, 1  $\mu$ g/mL oligomycin from Sigma-Aldrich (Oligo), 1  $\mu$ g/mL oligomycin from Cayman Chemical (Oligo\*), 1  $\mu$ g/mL oligomycin A (Oligo A) or 0.5  $\mu$ L DMSO were added, followed by sequential additions of CCCP (2  $\mu$ M each). **A:** SRC values for suspended T98G cells in the absence and presence of oligomycin or its A-isomer. **\*\***Statistically significant difference from the result for DMSO,  $P < 0.01$ . **B:** Values of CCCP concentrations required to achieve maximal OCR in T98G cells in the presence and absence of oligomycin or its A-isomer.

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g004

Next, we tested whether similar results would also be observed when CCCP is replaced by another potent protonophore or by a weaker protonophore, respectively FCCP or 2,4-dinitrophenol (DNP); the latter is less potent than CCCP and FCCP by two orders of magnitude [28]. The results when CCCP was replaced by FCCP were similar to those when CCCP was used (S3 File). Compared with the values for T98G cells treated with the vehicle DMSO before FCCP titration, SRC was underestimated by  $36.7 \pm 1.8\%$  in T98G cells treated with oligomycin (S3C File). As expected, the concentrations of FCCP (median concentration of 5  $\mu$ M) required to achieve maximal OCR in T98G cells were lower ( $P < 0.01$ ) (S3D File) than those required when CCCP was used (median concentration of 8  $\mu$ M).

Interestingly, when CCCP was replaced by DNP, lower maximal OCRs were observed for T98G and U-87MG cells (Fig 7, 7B, 7C and 7E), reaching similar values to those obtained with CCCP titration when oligomycin is present. The median DNP concentrations required for maximal OCR were 350  $\mu$ M and 200  $\mu$ M for T98G cells in the absence and presence of oligomycin and 250  $\mu$ M and 150  $\mu$ M for U-87MG cells in the absence and presence of oligomycin, respectively. The presence of oligomycin did not significantly decrease the SRC estimated by DNP titration, but the SRC values for both cells were similar to those obtained by CCCP titration in oligomycin-treated cells.

The absence of pyruvate in the incubation medium can underestimate the maximal OCR induced by FCCP in some cell lines and synaptosomes [29, 30]. We thus tested if pyruvate supplementation could eliminate the effects of oligomycin inhibiting maximal OCR obtained with protonophore (CCCP). Our results (Fig 8) indicate that pyruvate supplementation (10 mM) does not prevent the inhibitory effect of oligomycin on SRC determined for T98G cells. In addition, no significant difference was observed in basal and maximal OCR with pyruvate supplementation (results not shown). The lack of effect of pyruvate under our conditions may be



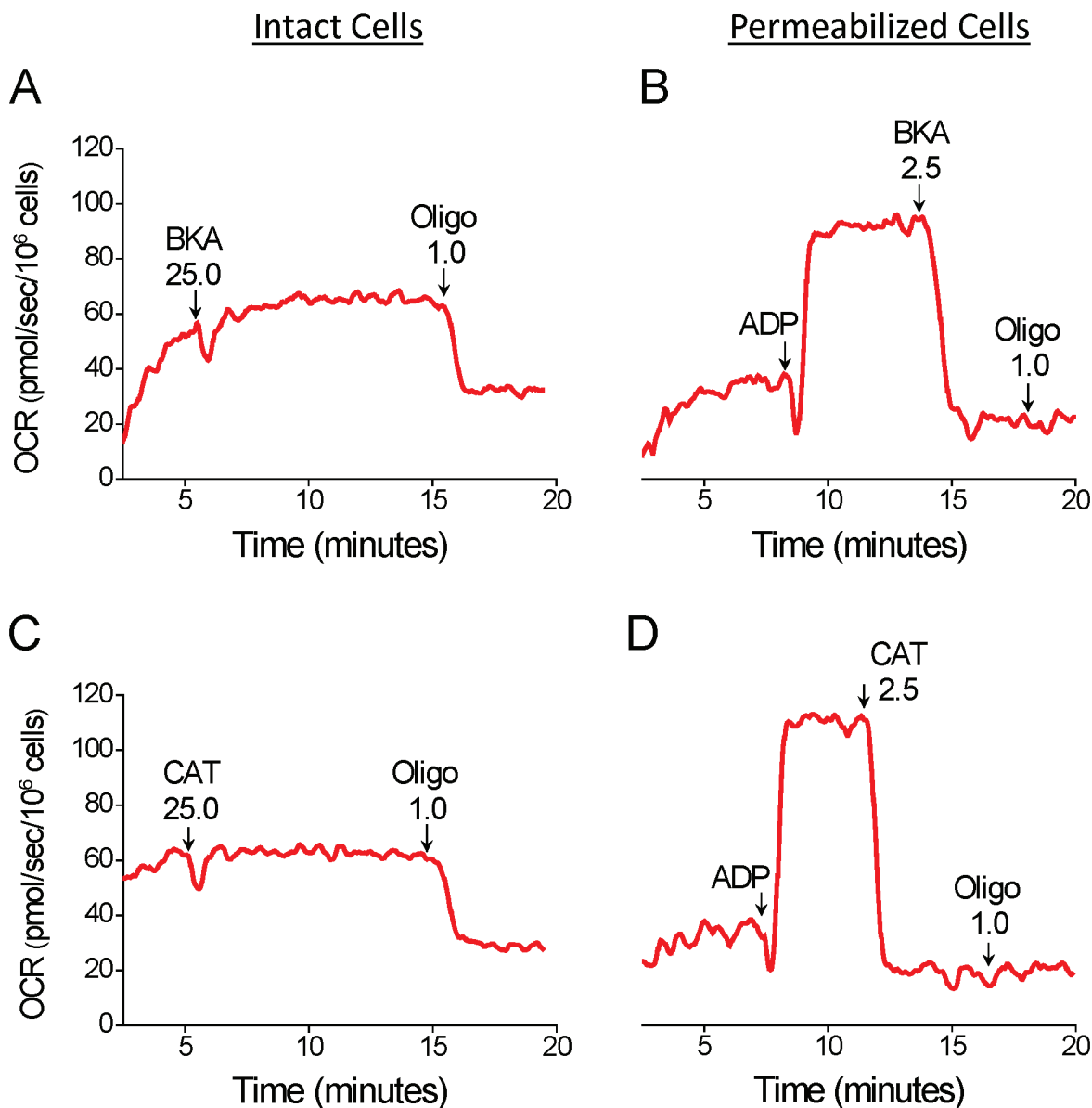
**Fig 5. Inhibitory effect of citreoviridin on CCCP-induced maximal oxygen consumption in T98G cells.** **A and B:** Representative OCR traces in suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL). Where indicated by the arrows, citreoviridin (Citre; 1  $\mu$ M, 4  $\mu$ M and 20  $\mu$ M) and 1  $\mu$ g/mL oligomycin (Oligo) were added. **C:** Representative traces of OCR in T98G cells. Where indicated by the arrows, 1  $\mu$ L DMSO or 20  $\mu$ M citreoviridin were added followed by sequential additions of CCCP (1  $\mu$ M each). **D:** SRC values for T98G cells in the presence and absence of 20  $\mu$ M citreoviridin. \*\*Statistically significant difference from the results for DMSO,  $P < 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g005

due to the weak mitochondrial oxidation of this substrate in high glycolytic tumor cells, which can use glutamine as a preferential respiratory substrate [31, 32].

Oligomycin has little or no inhibitory effect on CCCP-induced maximal OCR in permeabilized tumor cells or isolated brain mitochondria

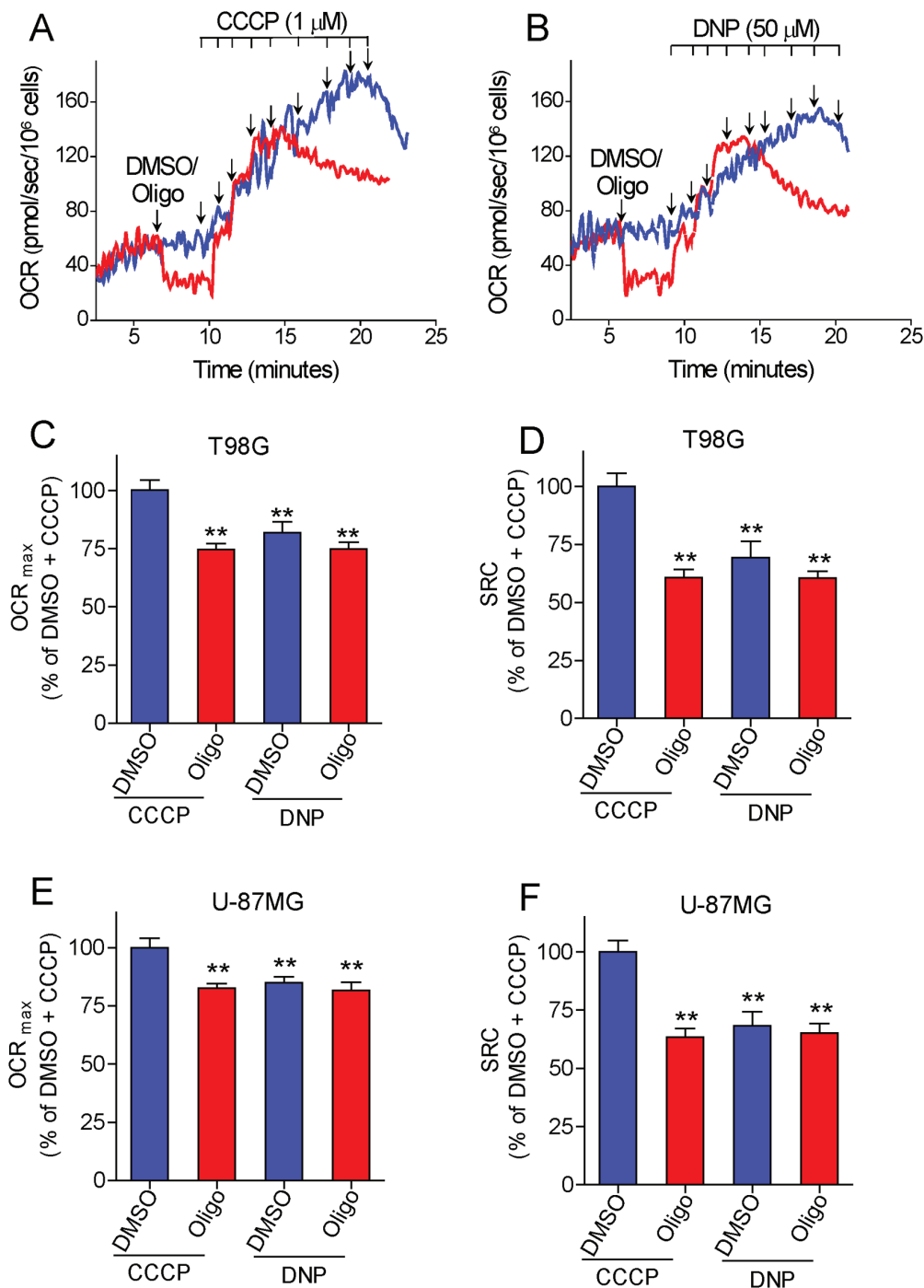
Fig 9 shows the results of CCCP-induced maximal OCR estimated in digitonin-permeabilized cells incubated in a reaction medium supplemented with exogenous respiratory substrates.



**Fig 6. Effect of bongkreikic acid (BKA) and carboxyatractyloside (CAT) on oxygen consumption due to oxidative phosphorylation in intact and digitonin-permeabilized T98G cells.** **A** and **C**: Representative OCR traces in intact T98G cells. Suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) were incubated in the medium for intact cells and, where indicated by the arrows, 25  $\mu$ M BKA, 25  $\mu$ M CAT and 1  $\mu$ g/mL oligomycin (Oligo) were added. **B** and **D**: Representative traces of OCR in digitonin-permeabilized T98G cells. A 125- $\mu$ L aliquot of T98G ( $3 \times 10^6$  cells) cell suspension was added to the final volume of 2 mL of reaction medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES- $K^+$  pH 7.2, 2 mM  $K_2HPO_4$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA and a cocktail of the respiratory substrates  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, glutamate and pyruvate, 5 mM of each) containing 30  $\mu$ M digitonin. Where indicated by the arrows, 800  $\mu$ M ADP, 2.5  $\mu$ M BKA, 2.5  $\mu$ M CAT and 1  $\mu$ g/mL oligomycin (Oligo) were added.

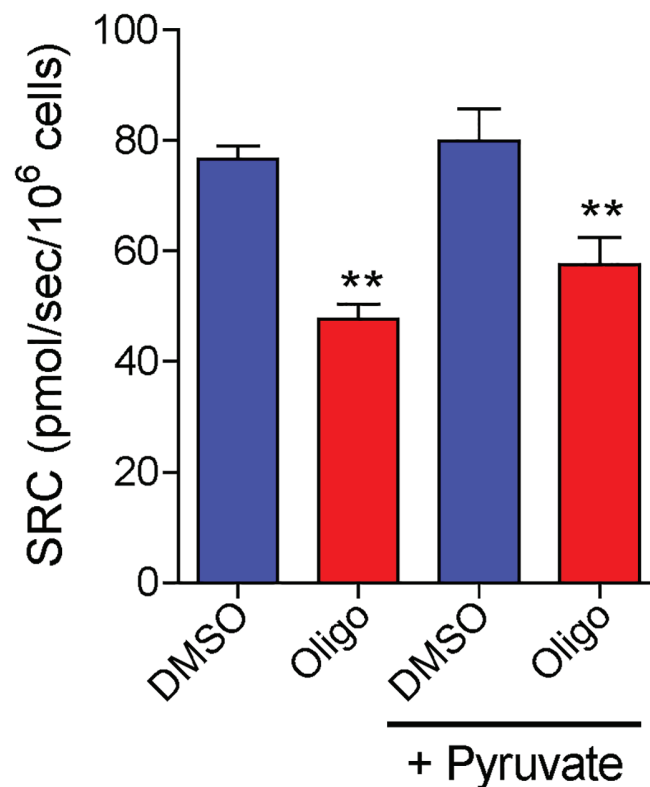
doi:10.1371/journal.pone.0150967.g006

Basal OCR was lower in permeabilized cells than in intact cells. This is due to the dilution of endogenous ADP after plasma membrane permeabilization with the consequent cessation of oxidative phosphorylation. In fact, the addition of oligomycin to respiring cells under basal conditions had little or no effect on OCR (Fig 9C and 9D). Unlike the results for intact tumor cells, the results in this case showed only a small inhibitory effect ( $11.5 \pm 3.5\%$ ) of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR estimated for U-87MG cells and no significant inhibitory



**Fig 7. Effect of oligomycin on 2,4-dinitrophenol (DNP)-induced maximal oxygen consumption in intact human glioma cells.** **A** and **B**: Representative oxygen consumption rate (OCR) traces of suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ). Where indicated by the arrows,  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) and DMSO ( $0.5 \mu\text{L}$  of each) were added, followed by sequential additions of CCCP ( $1 \mu\text{M}$  each) (**A**) or DNP ( $50 \mu\text{M}$  each) (**B**). **C** and **E**: Maximal OCR ( $\text{OCR}_{\text{max}}$ ) values for T98G (**C**) and U-87MG cells (**E**) determined by sequential additions of CCCP or DNP, in the presence and absence of oligomycin. Data are expressed as percentage of  $\text{OCR}_{\text{max}}$  obtained with CCCP titration in DMSO-treated cells (% of DMSO + CCCP). \*\*Statistically significant difference from the results for the "DMSO + CCCP" group,  $P < 0.01$ . **D** and **F**: SRC values for T98G (**D**) and U-87MG cells (**F**) determined by sequential additions of CCCP or DNP, in the presence and absence of oligomycin. Data are expressed as percentage of SRC obtained with CCCP titration in DMSO-treated cells (% of DMSO + CCCP). \*\*Statistically significant difference from the results for the "DMSO + CCCP" group,  $P < 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g007



**Fig 8. Pyruvate supplementation does not prevent the inhibitory effect of oligomycin on SRC determined for T98G cells.** T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) were incubated in the presence or absence of oligomycin (Oligo; 1  $\mu$ g/mL). Where indicated, the incubation medium was supplemented with 10 mM sodium pyruvate (+ Pyruvate). Maximal OCR for suspended T98G cells was determined by CCCP titration and SRC was calculated. \*\*Statistically significant difference from the results for DMSO,  $P < 0.01$ .

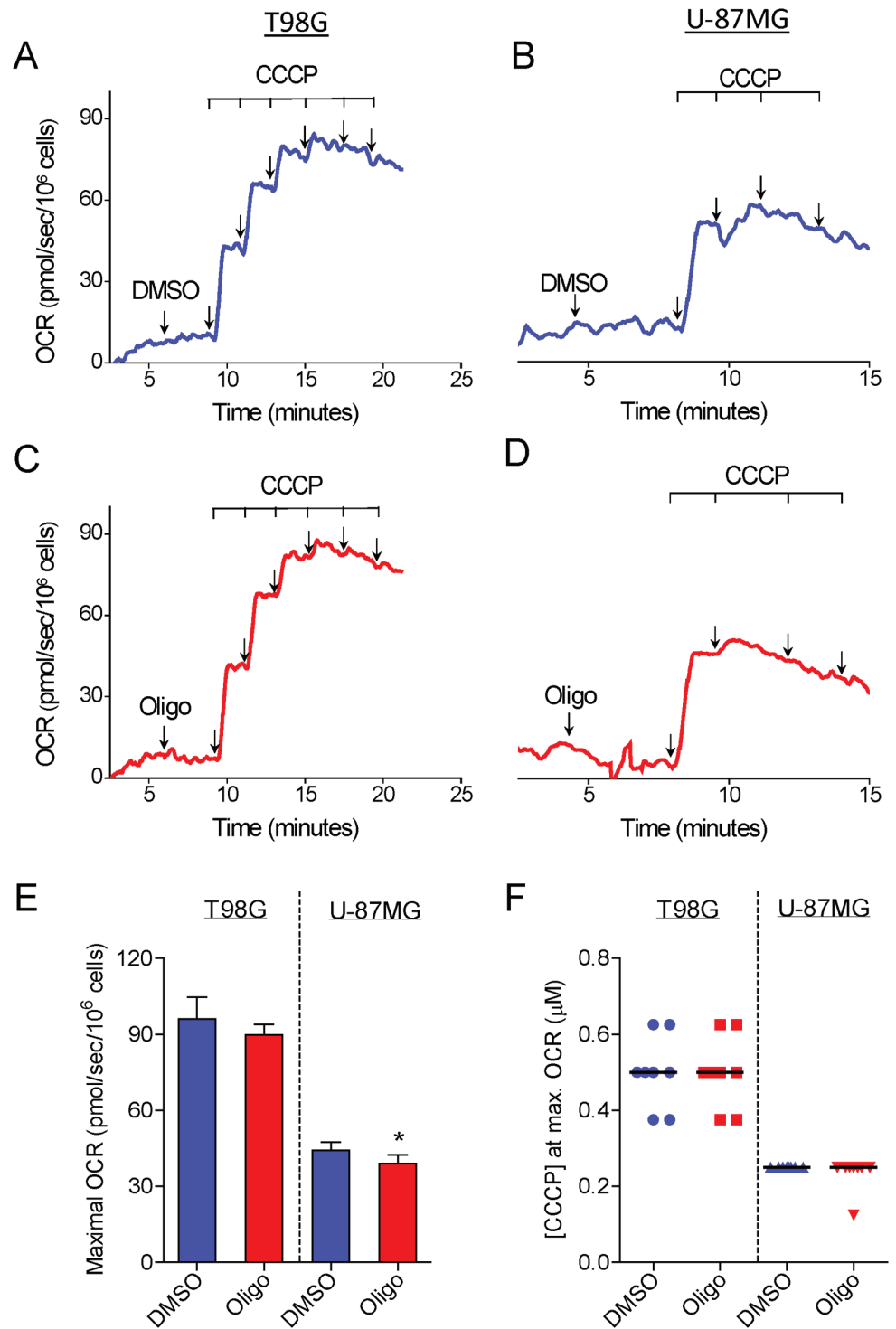
doi:10.1371/journal.pone.0150967.g008

effect when this parameter was estimated for T98G cells (Fig 9E). Maximal OCR in digitonin-permeabilized cells was about 75% of that observed with intact cells. Median concentrations of CCCP required to reach maximal OCR did not differ for glioma cells treated with oligomycin or with DMSO (Fig 9F). The CCCP concentration required to reach maximal OCR in permeabilized cells (0.5  $\mu$ M for T98G and 0.25  $\mu$ M U-87MG) was approximately 10 times lower than that for intact cells, mainly because of the absence of FBS in the incubation medium for the former. No significant increase in maximal OCR in permeabilized cells was observed when the medium was supplemented with 5  $\mu$ M cytochrome *c* (results not shown), indicating that the cells did not lose cytochrome *c* following treatment with digitonin.

As with permeabilized cells, CCCP-induced maximal OCR in isolated rat brain mitochondria was only slightly inhibited ( $10.0 \pm 1.1\%$ ) when oligomycin was added before titration with CCCP (Fig 10).

## Discussion

The data reported here show that the presence of the ATP synthase inhibitors oligomycin or citreoviridin results in underestimation of CCCP- or FCCP-induced maximal OCR in intact cultured cells. This effect was observed in both attached (Fig 3) and suspended cells (Figs 1, 4 and 5) (S1–S3 Files), but was nearly abolished in digitonin-permeabilized cells (Fig 9). The lower maximal OCR in cells when ATP synthase inhibitors were present results in



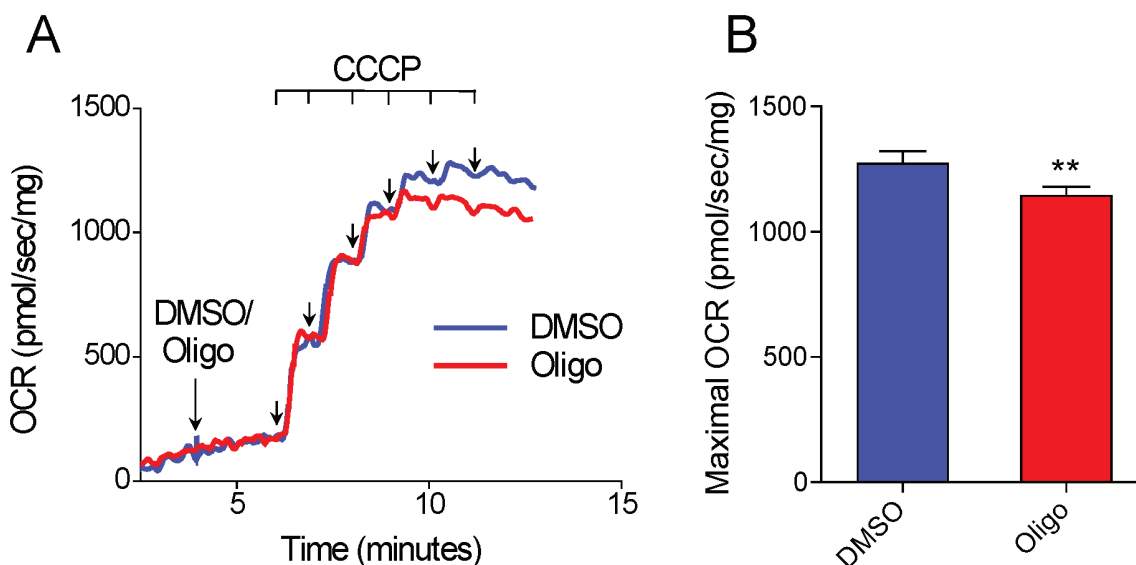
**Fig 9. Effect of oligomycin on CCCP-induced maximal oxygen consumption in digitonin-permeabilized human glioma cells.** A 125-μL aliquot of either T98G ( $3 \times 10^6$  cells) or U-87MG ( $4 \times 10^6$  cells) cell suspension was added to the final volume of 2 mL of reaction medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES- $K^+$  pH 7.2, 2 mM  $K_2HPO_4$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA and a cocktail of the respiratory substrates  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, glutamate and pyruvate, 5 mM of each) containing 30 μM digitonin. **A and C:** Representative OCR traces in suspended T98G cells. **B and D:** Representative OCR traces in suspended U-

87MG cells. Where indicated by the arrows, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) and 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO were added followed by sequential additions of CCCP (0.125  $\mu\text{M}$  each). At the beginning of the measurements, it took 3–5 min to obtain a stable basal OCR. **E:** Values of CCCP-induced maximal OCR for T98G and U-87MG cells in the presence and absence of oligomycin. \*Statistically significant difference from the results for the respective control (DMSO),  $P < 0.05$ . **F:** Values of CCCP concentrations required for maximal OCR in T98G and U-87MG cells in the presence and absence of oligomycin.

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g009

underestimation of the SRC. Under our experimental conditions, the SRC was underestimated by 25 to 45% when the tumor cell lines PC-3, T98G and U-87MG were assayed in the presence of oligomycin or citreoviridin. Oligomycin did not result in underestimation of SRC when maximal OCR was induced by the weaker protonophore DNP, but the lack of effect of oligomycin under these conditions is most likely related to the lower maximal OCR induced by DNP (Fig 7) as compared to more potent protonophores (i.e. CCCP or FCCP).

In the absence of ATP synthase inhibitors, higher concentrations of the protonophores CCCP and FCCP were required to achieve maximal OCR for intact cells (Figs 1 and 3–5) (S1 and S3 Files). This can be explained by the fact that when CCCP and FCCP promote a significant decrease in mitochondrial proton-motive force, reverse activity of ATP synthase occurs, with ATP hydrolysis driving proton pumping across the inner mitochondrial membrane [24, 33–35]. Under these conditions, the ATPase activity of ATP synthase occurs together with respiration-linked proton translocation through respiratory complexes I, III and IV into the inter-membrane space. Thus, higher protonophore concentrations are required to dissipate the proton-motive force and promote maximal OCR. The ATP synthase inhibitors oligomycin [36] or citreoviridin (at a high concentration) [37] inhibit the forward and reverse activities of the ATP synthase. As discussed below, decreased respiratory chain activity may also contribute to the lower protonophore concentration required to achieve maximal OCR in the presence of ATP synthase inhibitors.



**Fig 10. Oligomycin exerts only a minor inhibitory effect on CCCP-induced maximal oxygen consumption in isolated brain mitochondria.** Isolated rat brain mitochondria (0.3 mg/mL) were incubated at 37°C in a 2 mL chamber containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-K<sup>+</sup> pH 7.2, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM EGTA. **A:** Representative traces of OCR in isolated brain mitochondria. Where indicated by the arrows, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) or 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO were added, followed by sequential additions of CCCP (0.05  $\mu\text{M}$  each). At the beginning of the measurements, it took 3–5 min to obtain a stable basal OCR. **B:** Values of CCCP-induced maximal OCR for brain mitochondria in the presence and absence of oligomycin. \*\*Statistically significant difference from the results for DMSO,  $P < 0.01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0150967.g010



The inhibitory effect of oligomycin or citreoviridin on protonophore-induced maximal OCR seems to be associated with ATP synthase inhibition as the concentrations of these compounds required to achieve the reported undesired effect were similar to those that inhibit oxidative phosphorylation completely (Figs 2 and 5). ATP synthase inhibition may limit maximal OCR in cells by promoting changes in mitochondrial and cytosol adenylate energy charge, leading to decreased respiratory activity. Cells with high glycolytic activity, such as most tumor and proliferating non-tumor cells [3–5, 38], can partially maintain the intracellular ATP/ADP ratio even in the presence of respiratory chain inhibitors or protonophores as long as oligomycin is present to prevent consumption of ATP through reverse activity of ATP synthase [35, 38, 39]. A high intracellular ATP/ADP ratio may indirectly result in lower protonophore-induced maximal OCR because of a restraint in the availability or use of respiratory substrates by mitochondria. A high ATP/ADP ratio slows glycolysis [6, 40, 41], which generates the respiratory substrates glycerol-3-phosphate and pyruvate and limits the maximum activity of pyruvate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase [42, 43] and the citric acid cycle enzymes citrate synthase and isocitrate dehydrogenase [44–46]. When cells are permeabilized or isolated mitochondria are used, a high concentration of exogenous respiratory substrate is provided and glycolysis is not present to promote ATP resynthesis. Under these conditions the inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal OCR is minimized (Figs 9 and 10). In addition, ATP synthase inhibitors can also interact with non-specific targets, such as plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and metabolic enzymes [47–49]. This may indirectly alter cellular energy metabolism and/or mitochondrial membrane conformation, limiting the maximal OCR induced by protonophores.

Interestingly, our results indicate that the ANT inhibitors BKA and CAT had no effect on oxidative phosphorylation in intact T98G cells (Fig 6A and 6C) and therefore preclude the use of these compounds to substitute ATP synthase inhibitors in the protocol for estimation of maximal OCR in cells with previously inhibited oxidative phosphorylation. Nonetheless, BKA and CAT were effective inhibitors of oxidative phosphorylation in digitonin-permeabilized cells (Fig 6B and 6D). The fact that BKA and CAT had no effect on intact tumor cells may be due to the poor permeability of these compounds through the plasma membrane of tumor cells, the effective removal of these compounds from tumor cells via multidrug resistant ATP-binding cassette (ABC) transporters [50], or, as recently proposed by Maldonado and Lemasters [6], a different mechanism of mitochondrial ADP/ATP transport in tumor cells, possibly involving the ATP-Mg/ $\text{P}_i$  carrier. In fact, the ATP-Mg/ $\text{P}_i$  carrier is overexpressed in many tumor cells [51]. In the case of this last hypothesis, why the mitochondrial ATP-Mg/ $\text{P}_i$  carrier does not transport ADP/ATP in digitonin-permeabilized T98G cells (Fig 6B and 6D) remains to be clarified.

## Conclusion

Maximal OCR and SRC are valuable parameters that are widely used to assess cellular respiratory capacity in normal and tumor cells. Therefore, the effects of ATP synthase inhibitors on CCCP- or FCCP-induced maximal OCR and, consequently, on the estimation of SRC, should be carefully considered to avoid flawed interpretations. We conclude that unless a previously validated protocol is used, maximal OCR in intact cells should be determined in the absence of ATP synthase inhibitors.

## Supporting Information

**S1 File. Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal oxygen consumption in PC3 cells.** A and B: Representative OCR traces in suspended PC3 cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL).

Where indicated by the arrows, 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (Oligo) or 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO were added, followed by sequential additions of CCCP (1  $\mu\text{M}$  each). **C:** SRC values for PC3 cells in the presence and absence of oligomycin. \*\*Statistically significant difference from the results for DMSO,  $P < 0.01$ . **D:** Values of CCCP concentrations required to achieve maximal oxygen consumption rate in PC3 cells in the presence and absence of oligomycin.  
(PDF)

**S2 File. Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-stimulated oxygen consumption by T98G cells using a single addition of CCCP.** T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) were incubated and where indicated by the arrows, 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO or 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (Oligo) followed by CCCP were added (**A:** sequential additions of 1  $\mu\text{M}$  CCCP; **B** and **C:** only one addition of 6  $\mu\text{M}$  CCCP). Results are shown as percentages of OCR determined just before the addition of DMSO or oligomycin.  
(PDF)

**S3 File. Inhibitory effect of oligomycin on FCCP-induced maximal oxygen consumption by T98G cells.** **A** and **B:** Representative OCR traces by suspended T98G cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL). Where indicated by the arrows, 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (Oligo) or 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO were added followed by sequential additions of FCCP (1  $\mu\text{M}$  each). **C:** SRC values for T98G cells in the presence and absence of oligomycin. \*\*Statistically significant difference from the results for DMSO,  $P < 0.01$ . **D:** FCCP concentrations required for maximal OCR in T98G cells in the presence and absence of oligomycin.  
(PDF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Tiago R. Figueira for critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

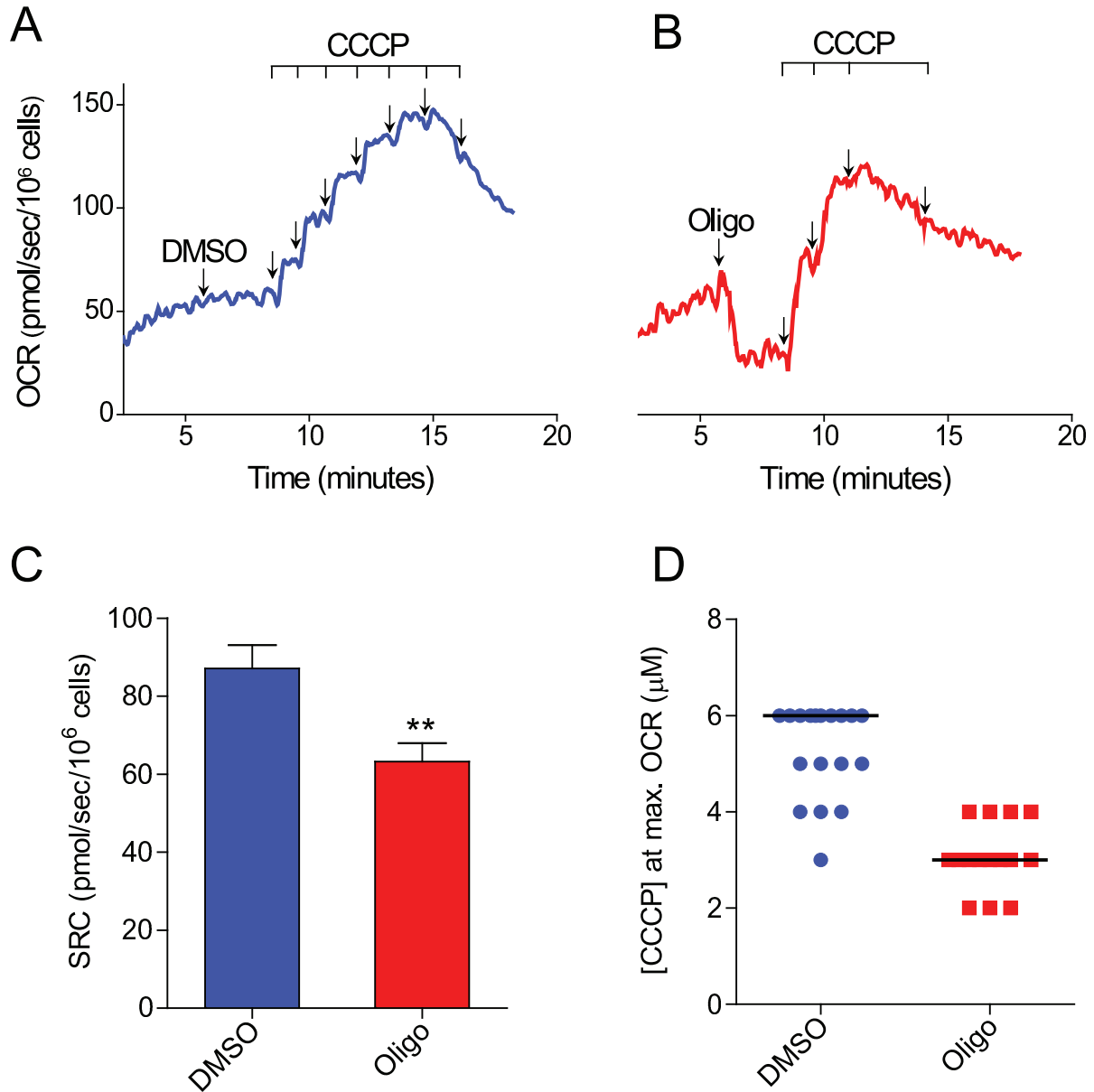
Conceived and designed the experiments: JSR IA AJK RFC. Performed the experiments: JSR ESSS IA ERS. Analyzed the data: JSR IA AJK RFC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AJK RFC. Wrote the paper: JSR IA AJK RFC.

## References

1. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011; 435: 297–312. doi: [10.1042/BJ20110162](https://doi.org/10.1042/BJ20110162) PMID: [21726199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21726199/)
2. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol.* 2012; 810: 25–58. doi: [10.1007/978-1-61779-382-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3) PMID: [22057559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22057559/)
3. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7: 11–20. doi: [10.1016/j.cmet.2007.10.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002) PMID: [18177721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18177721/)
4. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324: 1029–1033. doi: [10.1126/science.1160809](https://doi.org/10.1126/science.1160809) PMID: [19460998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460998/)
5. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012; 21: 297–308. doi: [10.1016/j.ccr.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014) PMID: [22439925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439925/)
6. Maldonado EN, Lemasters JJ. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. *Mitochondrion.* 2014; 19: 78–84. doi: [10.1016/j.mito.2014.09.002](https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.09.002) PMID: [25229666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25229666/)
7. Raimundo N, Baysal BE, Shadel GS. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med.* 2011; 17: 641–649. doi: [10.1016/j.molmed.2011.06.001](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.001) PMID: [21764377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21764377/)

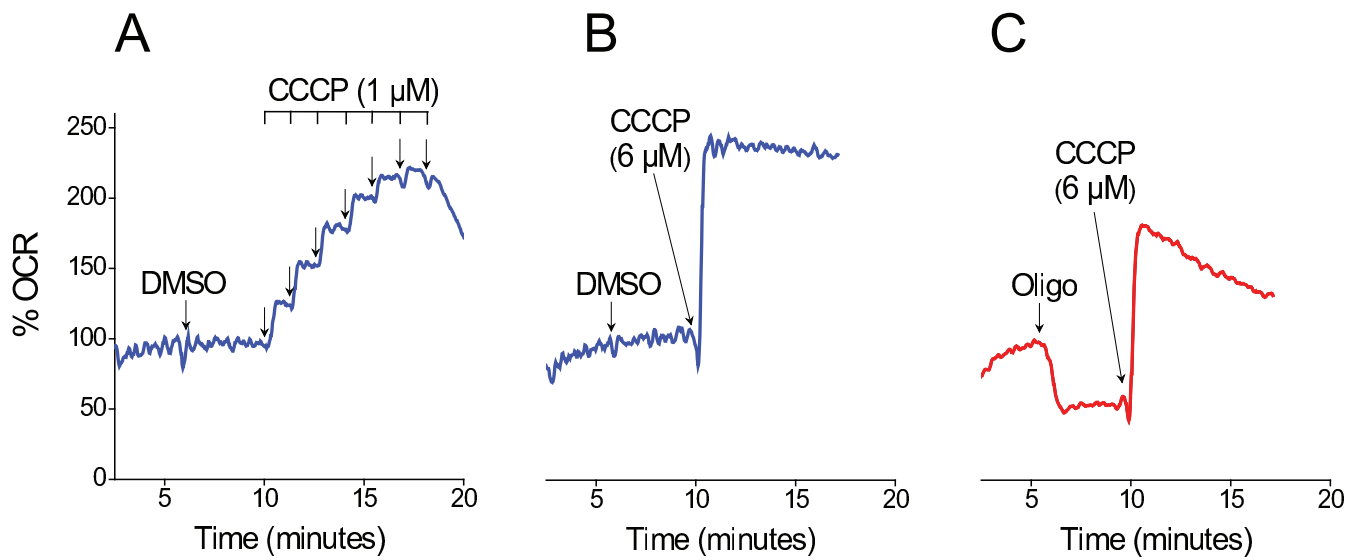
8. Senyilmaz D, Teleman AA. Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction. *F1000Prime Rep.* 2015; 7: 41. doi: [10.12703/P7-41](https://doi.org/10.12703/P7-41) PMID: [26097714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26097714/)
9. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 325–337. doi: [10.1038/nrc3038](https://doi.org/10.1038/nrc3038) PMID: [21508971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21508971/)
10. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 274: 1393–1418. PMID: [17302740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17302740/)
11. Viale A, Corti D, Draetta GF. Tumors and Mitochondrial Respiration: A Neglected Connection. *Cancer Res.* 2015; 75: 3687–3691.
12. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell.* 2015; 162: 540–551. doi: [10.1016/j.cell.2015.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016) PMID: [26232224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26232224/)
13. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell.* 2015; 162: 552–563. doi: [10.1016/j.cell.2015.07.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017) PMID: [26232225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26232225/)
14. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 447–464. doi: [10.1038/nrd3137](https://doi.org/10.1038/nrd3137) PMID: [20467424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20467424/)
15. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015; 59: 167–181. doi: [10.1016/j.biocel.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.12.008) PMID: [25542180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25542180/)
16. Chweih H, Castilho RF, Figueira TR. Tissue and sex specificities in  $\text{Ca}^{2+}$  handling by isolated mitochondria in conditions avoiding the permeability transition. *Exp Physiol.* 2015; 100: 1073–1092. doi: [10.1113/EP085248](https://doi.org/10.1113/EP085248) PMID: [26096641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096641/)
17. Michelini LG, Figueira TR, Siqueira-Santos ES, Castilho RF. Rotenone exerts similar stimulatory effects on  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by isolated brain mitochondria from young-adult and old rats. *Neurosci Lett.* 2015; 589: 25–30. doi: [10.1016/j.neulet.2015.01.030](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.030) PMID: [25596437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25596437/)
18. Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987; 7: 752–758. PMID: [3693430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3693430/)
19. Chance B, Williams GR, Hollunger G. Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. III. Spectroscopic and respiratory effects of uncoupling agents. *J Biol Chem.* 1963; 238: 439–444. PMID: [14020002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14020002/)
20. Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Margreiter R, Gnaiger E. Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996; 271: C2053–C2061. PMID: [8997208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8997208/)
21. Kenwood BM, Weaver JL, Bajwa A, Poon IK, Byrne FL, Murrow BA, et al. Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane. *Mol Metab.* 2013; 3: 114–123. doi: [10.1016/j.molmet.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005) PMID: [24634817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24634817/)
22. Lardy HA, Witonsky P, Johnson D. Antibiotics as tools for metabolic studies. IV. Comparative effectiveness of oligomycins A, B, C, and rutamycin as inhibitors of phosphoryl transfer reactions in mitochondria. *Biochemistry.* 1965; 4: 552–554. PMID: [14311628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14311628/)
23. Devenish RJ, Prescott M, Boyle GM, Nagley P. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *J Bioenerg Biomembr.* 2000; 32: 507–515. PMID: [15254386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15254386/)
24. Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72: 590–641. doi: [10.1128/MMBR.00016-08](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-08) PMID: [19052322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19052322/)
25. Gause EM, Buck MA, Douglas MG. Binding of citreoviridin to the beta subunit of the yeast  $\text{F}_1\text{-ATPase}$ . *J Biol Chem.* 1981; 256: 557–559. PMID: [6450205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6450205/)
26. Henderson PJ, Lardy HA. Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. *J Biol Chem.* 1970; 245: 1319–1326. PMID: [4245638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4245638/)
27. Vignais PV, Vignais PM, Defaye G. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin). *Biochemistry.* 1973; 12: 1508–1519. PMID: [4699983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4699983/)
28. Lou PH, Hansen BS, Olsen PH, Tullin S, Murphy MP, Brand MD. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. *Biochem J.* 2007; 407: 129–140. PMID: [17608618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17608618/)
29. Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem.* 2009; 109: 1179–1191. doi: [10.1111/j.1471-4159.2009.06055.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06055.x) PMID: [19519782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19519782/)
30. Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J Vis Exp.* 2010; 46: pii: 2511. doi: [10.3791/2511](https://doi.org/10.3791/2511) PMID: [21189469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21189469/)

31. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010; 35: 427–433. doi: [10.1016/j.tibs.2010.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003) PMID: [20570523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20570523/)
32. Israël M, Schwartz L. The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer.* 2011; 10: 70. doi: [10.1186/1476-4598-10-70](https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-70) PMID: [21649891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21649891/)
33. Feniouk BA, Yoshida M. Regulatory mechanisms of proton-translocating  $F_0F_1$ -ATP synthase. *Results Probl Cell Differ.* 2008; 45: 279–308. PMID: [18026702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18026702/)
34. Chinopoulos C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett.* 2011; 585: 1255–1259. doi: [10.1016/j.febslet.2011.04.004](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.004) PMID: [21486564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21486564/)
35. Ivanes F, Faccenda D, Gatiloff J, Ahmed AA, Cocco S, Cheng CH, et al. The compound BTB06584 is an IF1 -dependent selective inhibitor of the mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPase. *Br J Pharmacol.* 2014; 171: 4193–4206. doi: [10.1111/bph.12638](https://doi.org/10.1111/bph.12638) PMID: [24641180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24641180/)
36. Robertson AM, Holloway CT, Knight IG, Beechey RB. A comparison of the effects of NN'-dicyclohexylcarbodiimide, oligomycin A and aurovertin on energy-linked reactions in mitochondria and submitochondrial particles. *Biochem J.* 1968; 108: 445–456. PMID: [4299126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4299126/)
37. Linnett PE, Mitchell AD, Osselson MD, Mulheim LJ, Beechey RB. Citreoviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem J.* 1978; 170: 503–510. PMID: [148274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/148274/)
38. Hao W, Chang CP, Tsao CC, Xu J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J Biol Chem.* 2010; 285: 12647–12654. doi: [10.1074/jbc.M109.084194](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084194) PMID: [20110356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110356/)
39. Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 1998; 18: 10277–10286. PMID: [9852565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9852565/)
40. Hers HG, Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J.* 1982; 206: 1–12. PMID: [6289809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6289809/)
41. Mor I, Cheung EC, Voudsen KH. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011; 76: 211–216. doi: [10.1101/sqb.2011.76.010868](https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010868) PMID: [22096029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22096029/)
42. Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 1990; 4: 3224–3233. PMID: [2227213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2227213/)
43. Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 2012; 519: 69–80. doi: [10.1016/j.abb.2011.10.015](https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.015) PMID: [22079166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22079166/)
44. Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1980; 117 Suppl: K73–85. PMID: [6998729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6998729/)
45. Gabriel JL, Zervos PR, Plaut GW. Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism.* 1986; 35: 661–667. PMID: [3724458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3724458/)
46. Wiegand G, Remington SJ. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Chem.* 1986; 15: 97–117. PMID: [3013232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3013232/)
47. Datta SC, Ghosh JJ. Effect of citreoviridin, a toxin from *Penicillium citreoviride* NRRL 2579, on glycogen metabolism of rat brain. *Toxicon.* 1981A; 19: 217–222.
48. Datta SC, Ghosh JJ. Production and purification of *Penicillium citreoviride* toxin and its effect on TPP-dependent liver transketolase. *Folia Microbiol (Praha).* 1981B; 26: 408–412.
49. Arato-Oshima T, Matsui H, Wakizaka A, Homareda H. Mechanism responsible for oligomycin-induced occlusion of  $Na^+$  within  $Na/K$ -ATPase. *J Biol Chem.* 1996; 271: 25604–25610. PMID: [8810335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8810335/)
50. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 48–58. PMID: [11902585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902585/)
51. Traba J, Del Arco A, Duchon MR, Szabadkai G, Satrustegui J. SCaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix  $Ca^{2+}$  buffering. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 650–660. doi: [10.1038/cdd.2011.139](https://doi.org/10.1038/cdd.2011.139) PMID: [22015608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22015608/)



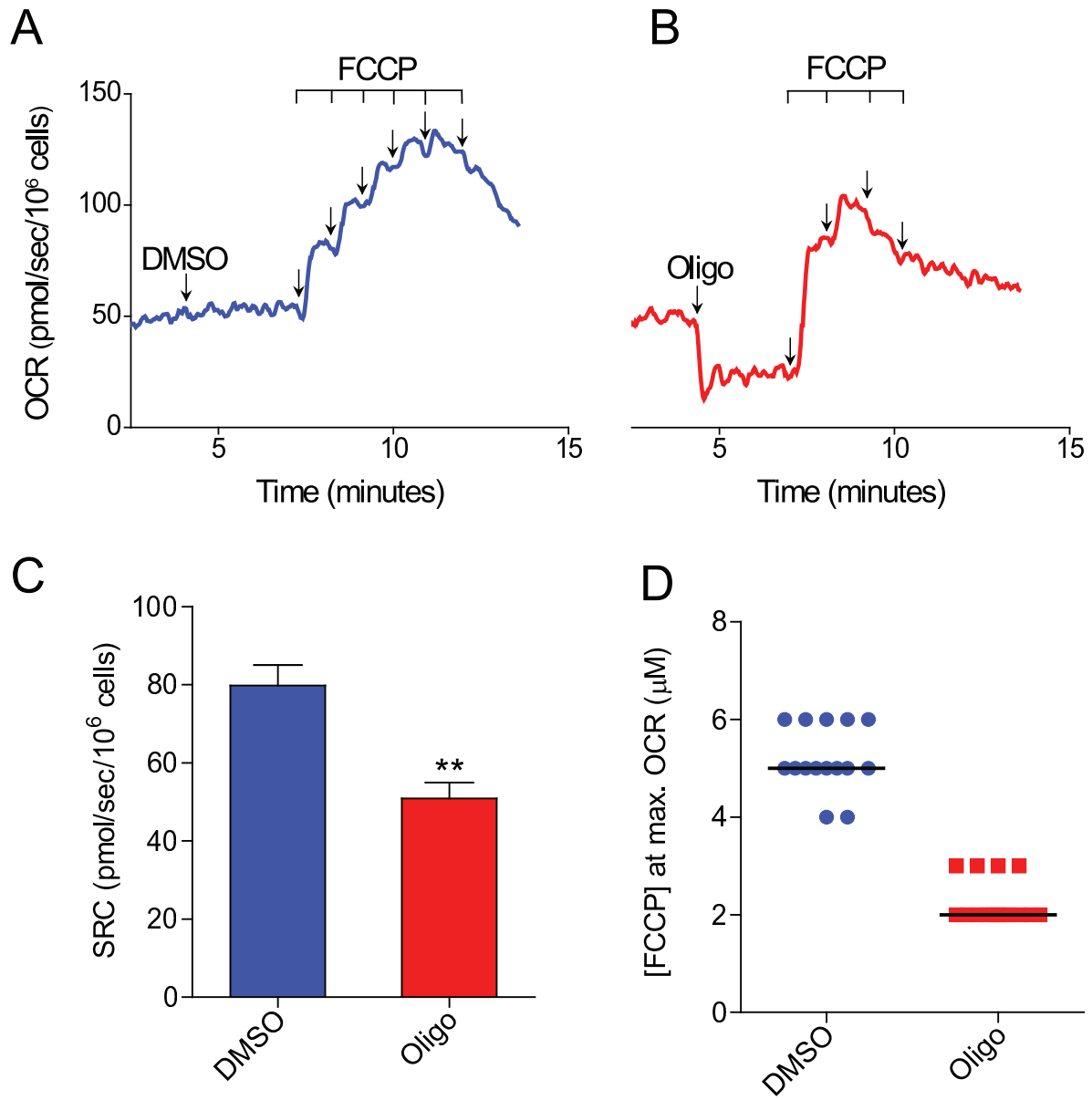
**S1 Fig.**

**Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced maximal oxygen consumption in PC3 cells.**



## S2 Fig.

**Inhibitory effect of oligomycin on CCCP-stimulated oxygen consumption by T98G cells using a single addition of CCCP.**



**S3 Fig.**

**Inhibitory effect of oligomycin on FCCP-induced maximal oxygen consumption by T98G cells.**

### 3.2. Capítulo II

**Ruas JS**, Siqueira-Santos ES, Rodrigues-Silva E, Castilho RF.

“High Glycolytic Activity of Tumor Cells Leads to Underestimation of Electron Transport System Capacity When Mitochondrial ATP Synthase Is Inhibited”.


**Scientific Reports**, 8: 17383, 2018.



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited

Juliana S. Ruas, Edilene S. Siqueira-Santos, Erika Rodrigues-Silva & Roger F. Castilho 

This study sought to elucidate how oligomycin, an ATP synthase blocker, leads to underestimation of maximal oxygen consumption rate ( $\text{maxOCR}$ ) and spare respiratory capacity (SRC) in tumor cells. T98G and U-87MG glioma cells were titrated with the protonophore CCCP to induce  $\text{maxOCR}$ . The presence of oligomycin (0.3–3.0  $\mu\text{g/mL}$ ) led to underestimation of  $\text{maxOCR}$  and a consequent decrease in SRC values of between 25% and 40% in medium containing 5.5 or 11 mM glucose. The inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  did not occur when glutamine was the metabolic substrate or when the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose was present. ATP levels were reduced and ADP/ATP ratios increased in cells treated with CCCP, but these changes were minimized when oligomycin was used to inhibit reverse activity of ATP synthase. Exposing digitonin-permeabilized cells to exogenous ATP, but not ADP, resulted in partial inhibition of CCCP-induced  $\text{maxOCR}$ . We conclude that underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC in tumor cells when ATP synthase is inhibited is associated with high glycolytic activity and that the glycolytic ATP yield may have an inhibitory effect on the metabolism of respiratory substrates and cytochrome c oxidase activity. Under CCCP-induced  $\text{maxOCR}$ , oligomycin preserves intracellular ATP by inhibiting ATP synthase reverse activity.

Mitochondrial oxidative metabolism has received increasing attention in different areas of cell biology research, including cell survival, growth and differentiation<sup>1–3</sup>. Some features of oxidative metabolism in tumor cells were characterized several decades ago, and two well-known metabolic properties, the Crabtree and Warburg effects, were described. The former involves the glycolytic metabolism-induced inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation<sup>4,5</sup>, and the latter involves a high glycolytic metabolism that results in the partial oxidation of glucose to pyruvate and its conversion to lactate even in the presence of molecular oxygen<sup>6,7</sup>.

Recently, there has been increased interest in the analysis of mitochondrial-function parameters in tumor cells, and this has been reflected in the growing number of studies showing the importance of mitochondrial oxidative metabolism in tumor cell pathophysiology<sup>3,8,9</sup>. One of the most common approaches used to evaluate mitochondrial bioenergetics in intact cells is measurement of the cellular oxygen consumption rate (OCR)<sup>10–12</sup>. The development of more accurate and user-friendly equipment for measuring oxygen consumption by intact or plasma membrane-permeabilized cells has contributed decisively to this field<sup>10,11,13</sup>. Measurements such as basal cellular respiration, maximal OCR ( $\text{maxOCR}$ ), spare respiratory capacity (SRC) (i.e., the difference between  $\text{maxOCR}$  and basal respiration), the fraction of oxygen consumption related to ATP regeneration and other parameters can be assessed using standard experimental protocols<sup>10–14</sup>.

The maximal capacity of the electron transport system (ETS) can be estimated by promoting protonophore-induced  $\text{maxOCR}$ . To determine an additional parameter in the same experimental run, the ATP synthase inhibitor oligomycin is usually added before the protonophore, and the fraction of basal OCR related to ATP regeneration is obtained. However, the presence of oligomycin leads to significant inhibition of  $\text{maxOCR}$ , resulting in

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.F.C. (email: [roger@fcm.unicamp.br](mailto:roger@fcm.unicamp.br))

underestimation of SRC in tumor cell lines<sup>14</sup>. We therefore recently proposed that  $\text{maxOCR}$  and SRC in tumor cells should preferably be estimated in the absence of oligomycin<sup>14</sup>.

The present study aimed to further characterize and identify the mechanisms that lead to the underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC in tumor cells when ATP synthase is inhibited. The results indicate that the inhibitory effect of ATP synthase blockers on  $\text{maxOCR}$  induced by the protonophore CCCP in tumor cells is associated with high glycolytic activity and maintenance of intracellular ATP levels.

## Results

**Occurrence of oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC in T98G glioma cells under different experimental conditions.** The concentration of oligomycin normally used in experimental protocols is 1  $\mu\text{g/mL}$ , while the minimal concentration to inhibit ATP synthase completely in intact tumor cells is approximately 0.1  $\mu\text{g/mL}$ <sup>14,15</sup>. A wide range of oligomycin concentrations (0.3, 1.0 and 3.0  $\mu\text{g/mL}$ ) was tested on OCR parameters in T98G cells. Similar underestimation of CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  and SRC was observed with the oligomycin concentrations tested (Fig. 1A–C). Figure 1D shows that the different oligomycin concentrations induced similar inhibitory effects on basal OCR, reflecting the fraction of oxygen consumption related to ATP synthesis and indicating that the oligomycin concentrations tested were equally efficient at inhibiting ATP synthase. Figure 1E depicts the effect of oligomycin on SRC when T98G glioma cells were incubated at a glucose concentration found under normoglycemic conditions (i.e., 5.5 mM), instead of 11 mM. Under this condition, the SRC value was  $31.6 \pm 4.2\%$  lower when estimated in the presence of oligomycin than in the control (vehicle (DMSO) without oligomycin).

The influence of sodium bicarbonate (Fig. 2) and FBS (Fig. 3) on the oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC was also tested in T98G cells. Figure 2 shows the  $\text{maxOCR}$  and SRC for intact T98G cells incubated in the presence or absence of sodium bicarbonate. Increased  $\text{maxOCR}$  and SRC (Fig. 2) was observed in the absence of sodium bicarbonate under control conditions (DMSO). Nevertheless, similar oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC was observed both in the presence and absence of sodium bicarbonate. The oligomycin-induced inhibition of SRC in the presence and absence of sodium bicarbonate was  $38.0 \pm 2.5\%$  and  $35.2 \pm 1.5\%$ , respectively.

Next, the effect of FBS was evaluated on the oligomycin-induced inhibition of  $\text{maxOCR}$  and SRC in T98G cells (Fig. 3). As expected, a lower concentration of CCCP (not shown) was required to achieve  $\text{maxOCR}$  in the absence of FBS as this protonophore can bind non-specifically to FBS proteins. We observed a non-significant trend toward lower  $\text{maxOCR}$  and SRC in the absence of FBS. Oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  was  $19.9 \pm 3.9\%$  in the presence of FBS and  $15.9 \pm 2.2\%$  in its absence, whereas underestimation of SRC was  $33.7 \pm 4.3\%$  in the presence of FBS and  $30.0 \pm 2.4\%$  in its absence.

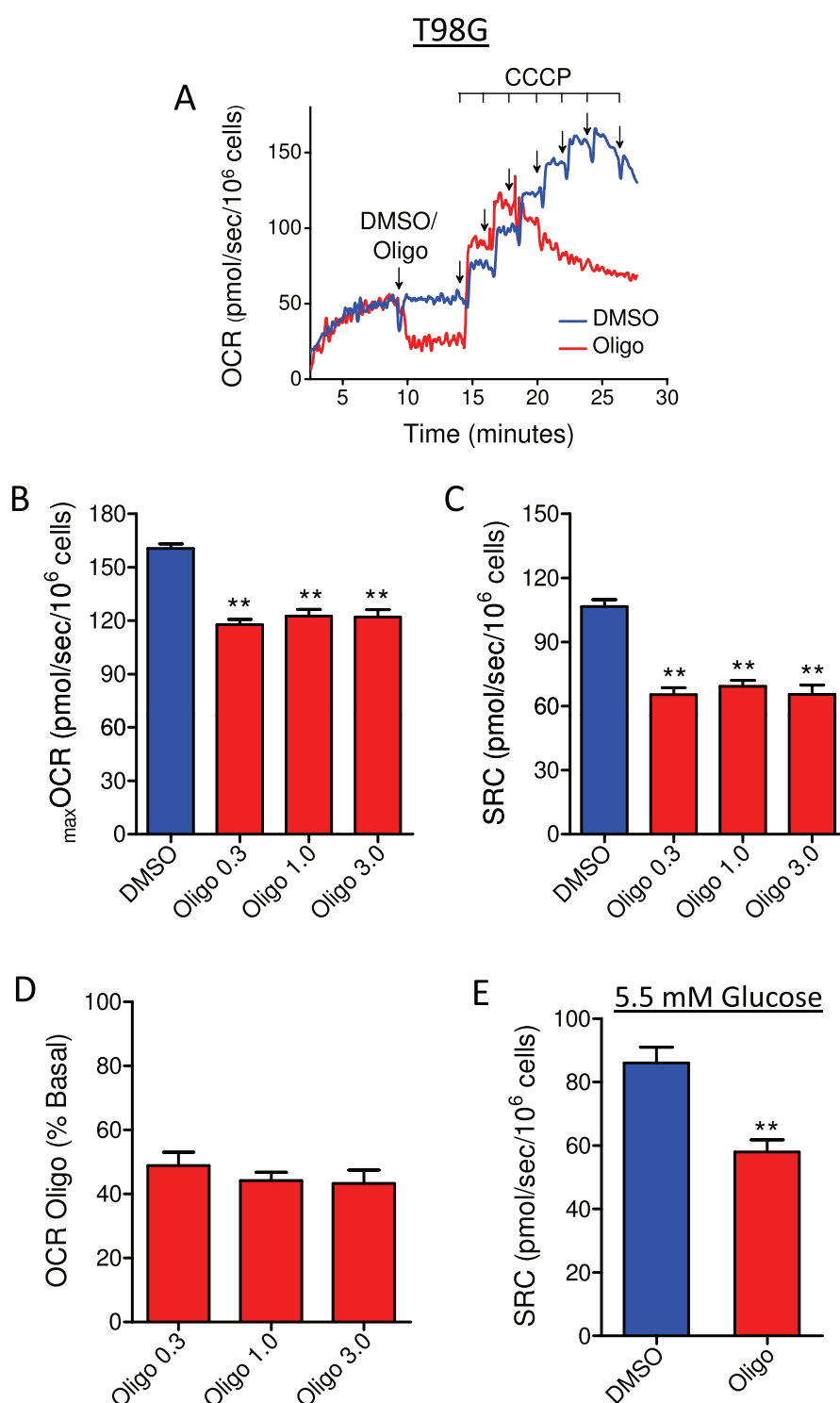
The possible interference of multiple CCCP additions with a consequent long exposure time to oligomycin and CCCP to assess  $\text{maxOCR}$  and SRC in cell lines was investigated by performing a single addition of CCCP to T98G cells (Fig. 4). First, a suboptimal CCCP concentration (3  $\mu\text{M}$ ) was added, and this resulted in similar stimulation of OCR in the absence or presence of oligomycin (Fig. 4A). A 6  $\mu\text{M}$  CCCP concentration was then tested, and a higher OCR was observed under the control condition (DMSO) but lower stimulation of OCR was observed when oligomycin was present (Fig. 4B). Finally,  $\text{maxOCR}$  was achieved under DMSO conditions using 9  $\mu\text{M}$  CCCP, although progressive inhibition of  $\text{maxOCR}$  occurred immediately after addition of 9  $\mu\text{M}$  CCCP under both the control and oligomycin conditions (Fig. 4C).

Taken together, these results indicate that the inhibitory effect of oligomycin on  $\text{maxOCR}$  and, consequently, SRC is related neither to the characteristics of the medium (i.e., glucose concentration and the presence or absence of bicarbonate buffer and FBS) nor to excess concentrations of or long exposure to oligomycin or CCCP.

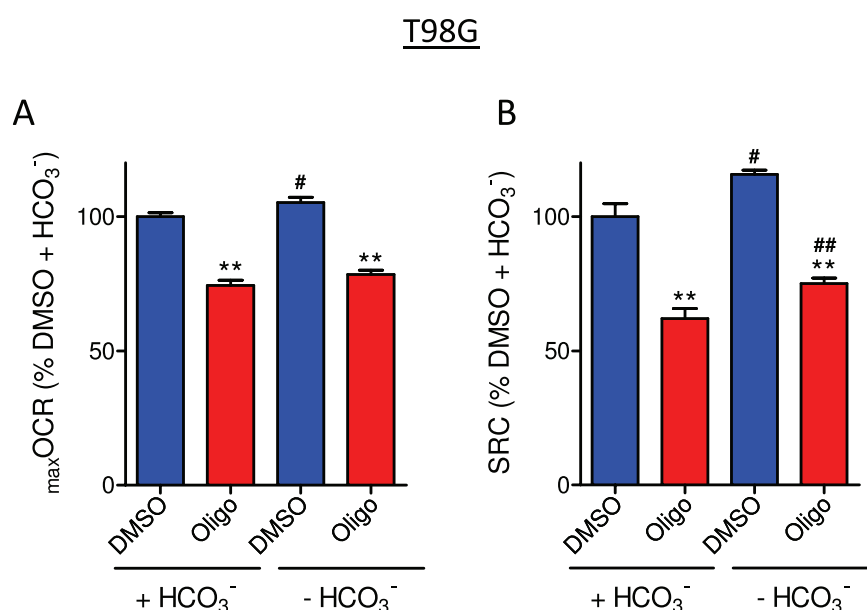
## The high glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of $\text{maxOCR}$ and SRC in the presence of oligomycin.

As we reported previously<sup>14</sup>, supplementing the medium with pyruvate only slightly decreased the oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC, suggesting that this effect is not associated with a limited supply of respiratory substrates to mitochondria. We hypothesized that this effect might be associated with the high glycolytic activity of tumor cells. To investigate the role of glycolysis in the underestimation of  $\text{maxOCR}$  and SRC in the presence of oligomycin, the influence of this metabolic pathway was minimized in two different ways. First, cells were incubated in DMEM without glucose and pyruvate but containing 4 mM glutamine, a substrate that is metabolized to produce  $\alpha$ -ketoglutarate, an intermediate of the citric acid cycle. For comparison, experiments were also conducted using DMEM containing all metabolic substrates (11 mM glucose, 1.25 mM pyruvate and 4 mM glutamine) (Figs 5 and 6). Second, cells were incubated in supplemented DMEM (sDMEM) containing the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG; 40 mM), a glucose analog metabolized by hexokinase at the expense of ATP, generating the non-metabolizable molecule 2-deoxyglucose-6-phosphate and thus partially inhibiting glycolysis<sup>16,17</sup> (Figs 7 and 8). The use of these two approaches to investigate the role of glycolysis is important since 2-DG also has effects on signal transduction that are unrelated to glycolysis inhibition<sup>18</sup>.

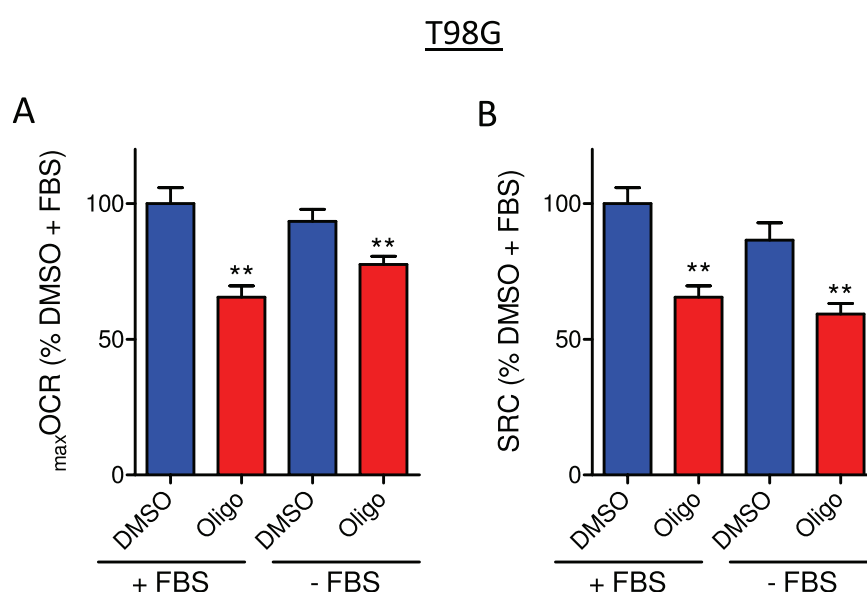
Figures 5 and 6 show that using only glutamine as the metabolic substrate, the underestimation caused by oligomycin on  $\text{maxOCR}$  (Figs 5C and 6A) and SRC (Figs 5D and 6B) was not observed in either T98G or U-87MG cells. Measurements of OCR in T98G cells showed a higher basal OCR with DMEM containing only glutamine than with DMEM containing all the substrates (Fig. 5A,B), an effect likely related to the absence of the glycolytic metabolism-induced inhibition of oxidative phosphorylation (i.e., the Crabtree effect). Notably, SRC in the presence of glutamine alone was lower than in the presence of all the substrates under DMSO conditions. This decrease in SRC was expected because basal respiration increases with glutamine but  $\text{maxOCR}$  does not. The data in Fig. 5E indicate that in medium containing only glutamine, oxidative metabolism in T98G cells cannot



**Figure 1.** Effect of different concentrations of oligomycin and glucose on CCCP-induced maximal oxygen consumption rate ( $\text{maxOCR}$ ) in T98G human glioma cells. T98G cells ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) were resuspended in sDMEM containing 20 mM HEPES and 11 mM (A–D) or 5.5 mM (E) glucose. CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  was determined with different concentrations of oligomycin (0.3, 1.0 and 3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or without oligomycin, which was replaced by an equal volume of DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ). (A) Representative traces of OCR in T98G cells incubated in sDMEM. Where indicated by arrows, DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ) or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) was added, followed by sequential additions of CCCP (2  $\mu\text{M}$  each). (B,C) Effect of different concentrations of oligomycin on  $\text{maxOCR}$  and SRC (i.e., the difference between  $\text{maxOCR}$  and basal OCR). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ . (D) Effect of different concentrations of oligomycin on basal OCR. The data are expressed as a percentage of basal OCR. (E) Effect of oligomycin (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on SRC values for T98G cells incubated in sDMEM containing 5.5 mM glucose. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ .

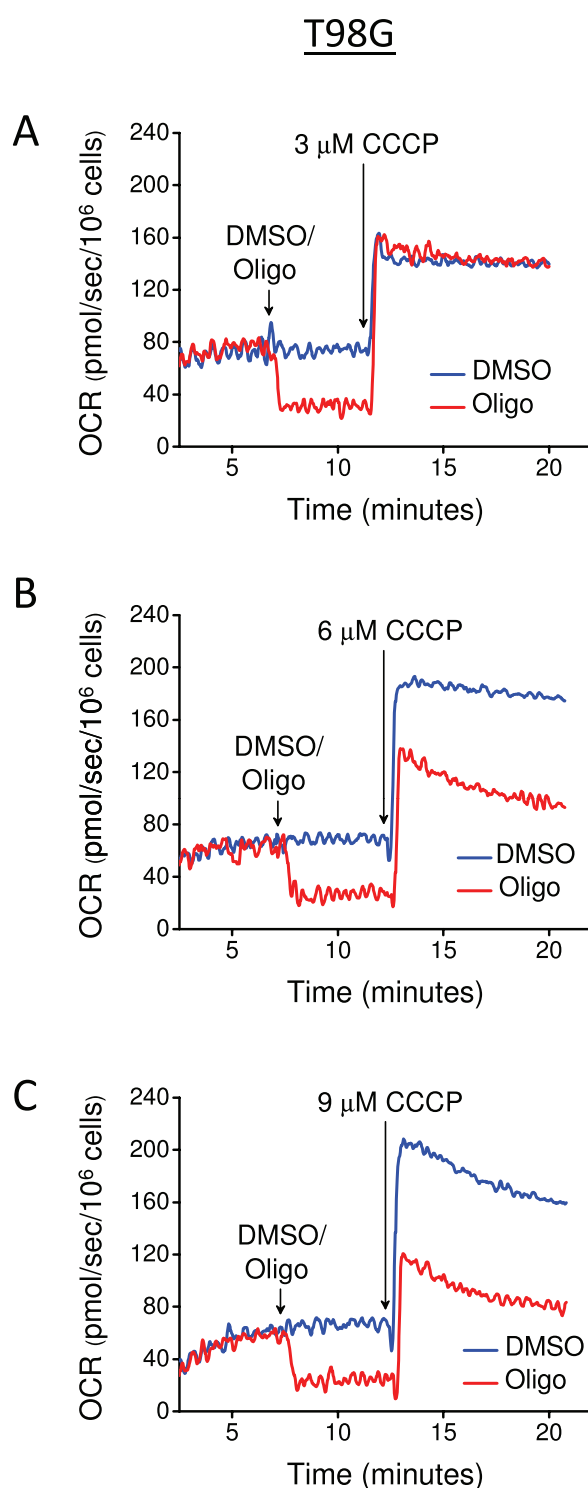


**Figure 2.** Effect of sodium bicarbonate on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  in T98G glioma cells. T98G cells ( $1.5 \times 10^6$ /mL) were incubated in sDMEM containing 20 mM HEPES with or without 44 mM sodium bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). The experiments were conducted by adding DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ) or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) after basal respiration was reached, followed by sequential additions of CCCP (2  $\mu\text{M}$  each). (**A,B**) Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  and estimated SRC for T98G cells. The data were normalized as a percentage of  $\text{maxOCR}$  (**A**) or SRC (**B**) observed under the DMSO condition in the presence of  $\text{HCO}_3^-$  (% DMSO +  $\text{HCO}_3^-$ ). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \*\* $P < 0.01$ . Statistically significant difference in relation to the corresponding condition with sodium bicarbonate, # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$ .



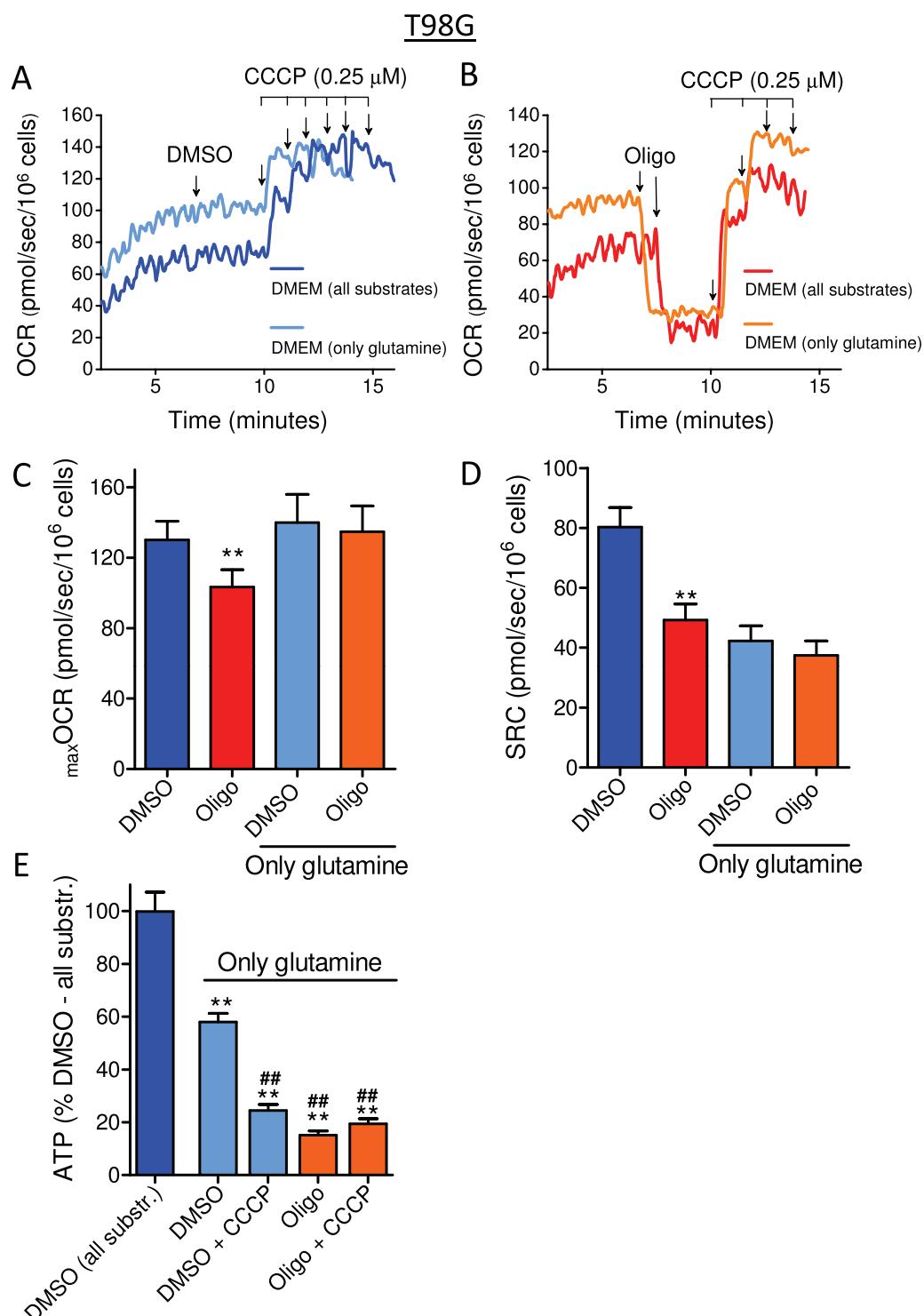
**Figure 3.** Effect of medium supplementation with fetal bovine serum on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  in T98G glioma cells. T98G cells ( $1.0 \times 10^6$ /mL) were incubated in DMEM containing 20 mM HEPES with or without 10% fetal bovine serum (FBS). The experiments were conducted by adding DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ) or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) after stable basal respiration rate was reached, followed by sequential additions of CCCP (+FBS: 2  $\mu\text{M}$  in each addition, -FBS: 0.3  $\mu\text{M}$  in each addition). (**A,B**) Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  and estimated SRC for T98G cells. The data were normalized as a percentage of  $\text{maxOCR}$  (**A**) or SRC (**B**) observed under the DMSO condition in the presence of FBS (% DMSO + FBS). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \*\* $P < 0.01$ .

maintain the cellular ATP levels observed under control conditions (all substrates). As expected, inhibiting mitochondrial ATP synthesis with either CCCP or oligomycin decreased cellular ATP levels sustained by glutamine metabolism.



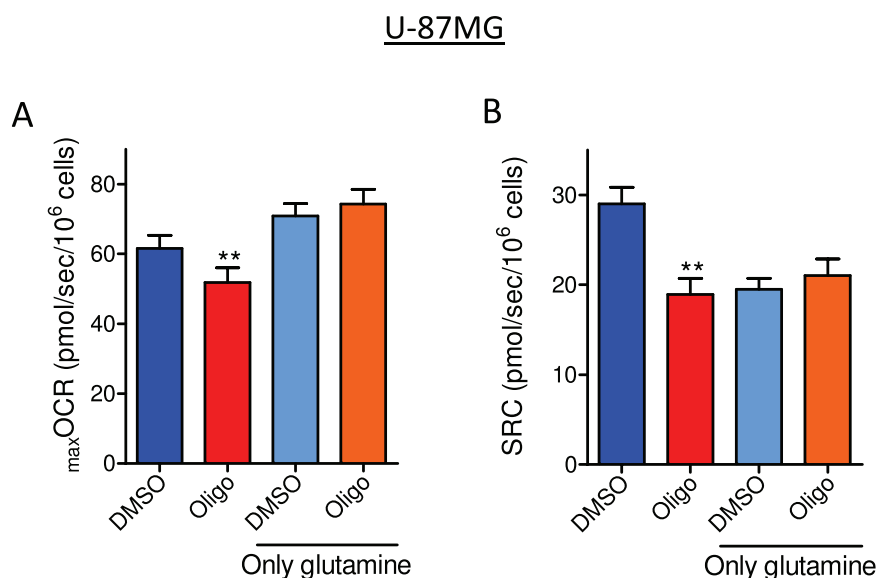
**Figure 4.** Inhibitory effect of oligomycin on  $\text{max}$  OCR induced by a single addition of CCCP to T98G human glioma cells. T98G cells ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were incubated in sDMEM containing 20 mM HEPES. Where indicated by the arrows, 0.5  $\mu\text{L}$  DMSO or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) was added to the cells, followed by a single addition of CCCP (**A**: 3  $\mu\text{M}$ ; **B**: 6  $\mu\text{M}$ ; **C**: 9  $\mu\text{M}$ ).

Figures 7 and 8 show that the glycolytic inhibitor 2-DG completely prevented the underestimation of  $\text{max}$  OCR (Figs 7A and 8A) and SRC (Figs 7B and 8B) due to oligomycin in T98G and U-87MG cells. These results suggest that underestimation of  $\text{max}$  OCR and SRC in the presence of oligomycin is associated with high cellular glycolytic activity, a predominant pathway for ATP regeneration in these tumor cells<sup>19</sup>. Next, cellular ATP content was measured under the same conditions used in the respirometry experiments, i.e., both cell lines were incubated in the presence or absence of oligomycin in sDMEM or sDMEM plus 40 mM 2-DG.



**Figure 5.** Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max}_{\text{OCR}}$  in T98G glioma cells incubated in medium containing glutamine as the only metabolic energy substrate. T98G cells ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were incubated in non-supplemented DMEM containing 20 mM HEPES and all the metabolic energy substrates (11 mM glucose, 4 mM glutamine and 1.25 mM pyruvate) or only 4 mM glutamine. (A,B) Representative traces of OCR in T98G cells incubated in medium containing all the metabolic energy substrates or only glutamine. Where indicated by arrows, DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ) or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo) was added, followed by sequential additions of CCCP (0.25  $\mu\text{M}$  each). (C,D) Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max}_{\text{OCR}}$  (C) and estimated SRC (D) for T98G cells. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ . (E) Measurements of ATP levels in T98G cells incubated in medium containing all the metabolic energy substrates or only glutamine. Data were normalized as a percentage of the values of ATP in DMSO and all the substrates (% DMSO – all substr.). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO) containing all substrates,  $**P < 0.01$ . Statistically significant difference in relation to the control (DMSO) containing only glutamine,  $##P < 0.01$ .





**Figure 6.** Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max OCR}$  in U-87MG glioma cells incubated in medium containing glutamine as the only metabolic energy substrate. U-87MG ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) cells were incubated in non-supplemented DMEM containing 20 mM HEPES and all the metabolic energy substrates (11 mM glucose, 4 mM glutamine, 1.25 mM pyruvate) or only 4 mM glutamine. (A,B) Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max OCR}$  (A) and estimated SRC (B) for U-87MG cells. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \*\* $P < 0.01$ .

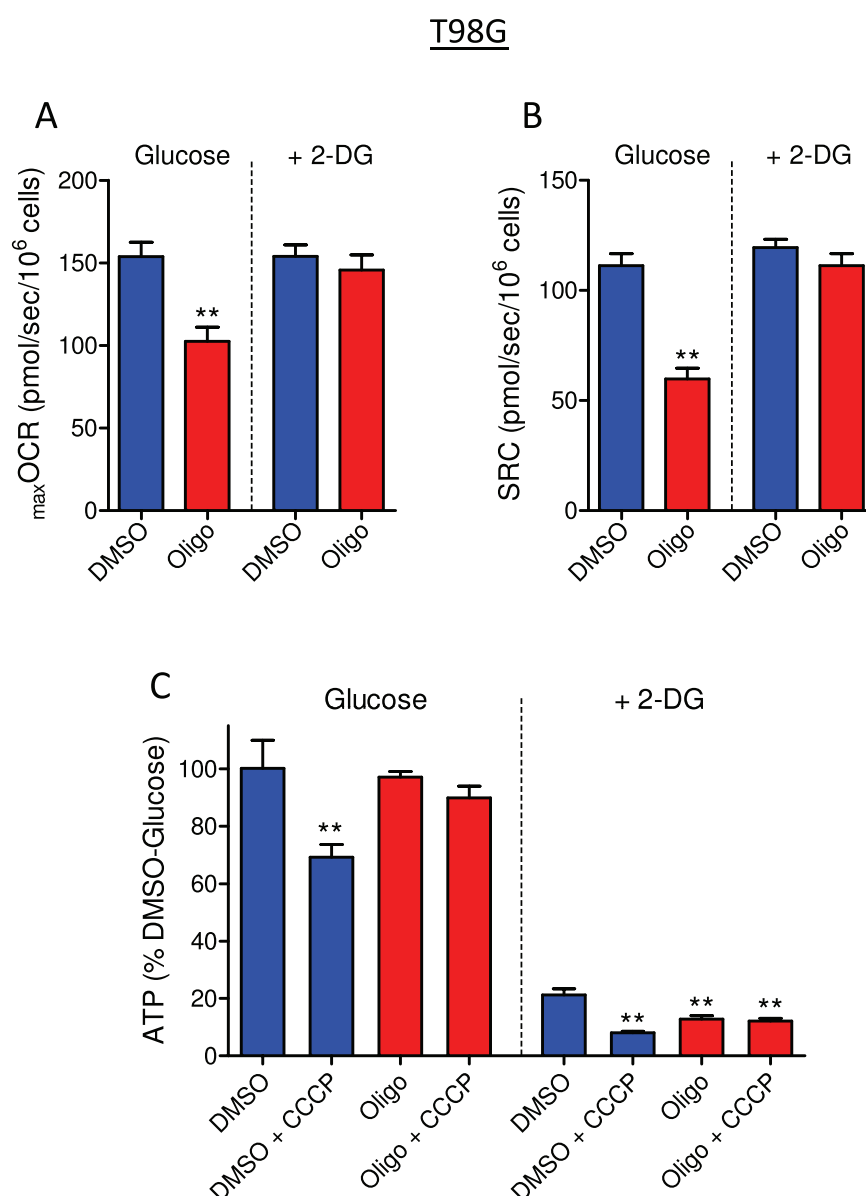
When ATP synthase was inhibited using oligomycin, no significant drop in ATP levels was observed in T98G and U-87MG cells incubated with sDMEM (Figs 7C and 8C), indicating that the ATP measured is produced mainly by glycolysis. When cells were incubated in sDMEM plus CCCP, ATP levels decreased by  $26.6 \pm 6.6\%$  in T98G cells and  $21.6 \pm 6.1\%$  in U-87MG cells in relation to the control (DMSO). Under this condition, mitochondrial ATP synthase is expected to hydrolyze ATP to restore the  $\Delta\psi_m$  that the protonophore CCCP dissipated<sup>20,21</sup>. In fact, when CCCP was added in the presence of oligomycin, cellular ATP levels were maintained because ATP synthase was prevented from operating in the reverse mode. In addition, the results in Fig. 9 show that the decrease in ATP levels induced by CCCP was accompanied by increased ADP/ATP ratios in both T98G and U-87MG cells in a mechanism sensitive to oligomycin.

Incubating the cells in sDMEM containing 2-DG resulted in a significant drop in ATP levels of  $75.6 \pm 4.0\%$  in T98G cells and  $83.5 \pm 1.9\%$  in U-87MG cells (Figs 7C and 8C), further suggesting that most cellular ATP in glioma cell lines is produced by glycolysis<sup>19</sup>. Induction of the Crabtree effect by 2-DG<sup>22</sup> may also contribute to ATP depletion under this condition. When CCCP, oligomycin or oligomycin plus CCCP were present with 2-DG, the ATP levels in T98G cells dropped by  $91.0 \pm 1.2\%$ ,  $86.0 \pm 1.7\%$  and  $86.8 \pm 1.8\%$ , respectively (Fig. 7C). The same pattern was observed when U-87MG cells were tested with 2-DG (Fig. 8C).

To investigate the importance of the inhibitory effect of oligomycin on the reverse activity of ATP synthase, we conducted experiments with citreoviridin. Low concentrations of citreoviridin inhibit the forward reaction of ATP synthase, with a minor effect on the reverse activity of this enzyme. However, higher concentrations of citreoviridin can inhibit forward and reverse activities<sup>23,24</sup>. Two different concentrations of citreoviridin were tested: 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ . Figure 10(A,B) shows that 5  $\mu\text{M}$  citreoviridin did not affect  $\text{max OCR}$  and SRC. However, as shown previously<sup>14</sup>, in the presence of 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin,  $\text{max OCR}$  and SRC were underestimated by  $18.9 \pm 4.5\%$  and  $26.7 \pm 5.9\%$ , respectively, an effect similar to that observed in the presence of oligomycin.

The inhibitory effect of citreoviridin on the forward activity of ATP synthase was assessed based on its effect on basal OCR and compared with the effect of 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin<sup>14</sup>. The inhibitory effect on the reverse activity of ATP synthase was estimated by measuring the dissipation of  $\Delta\psi_m$  under conditions in which the respiratory chain was inhibited by antimycin A (Fig. 10C). In our previous study, the forward activity of ATP synthase, which was measured indirectly as the fraction of OCR due to ATP turnover, was inhibited by  $84.8 \pm 1.7\%$  in the presence of 5  $\mu\text{M}$  citreoviridin and was completely inhibited by 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin (see Fig. 5A,B in<sup>14</sup>). However, the membrane potential maintained by the reversed activity of ATP synthase was only  $30.0 \pm 3.0\%$  and  $58.5 \pm 4.7\%$  sensitive to 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin, respectively (Fig. 10C,D). These results indicate that a low concentration (5  $\mu\text{M}$ ) of citreoviridin can almost completely inhibit the forward reaction of ATP synthase and has a small effect on its reverse activity. Interestingly, this low concentration of citreoviridin does not reflect the underestimation of  $\text{max OCR}$  and SRC produced by oligomycin.

Next, the effect of CCCP on ATP levels was measured in the presence of 5 and 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin (Fig. 10E). Compared with the control condition (DMSO), CCCP reduced ATP by  $27.9 \pm 6.9\%$ . The lower concentration of citreoviridin (5  $\mu\text{M}$ ) did not significantly prevent the ATP drop induced by CCCP (ATP drop of  $17.6 \pm 8.6\%$ ). However, CCCP did not induce a significant drop in ATP levels in the presence of 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin. This latter result is in accordance with the important inhibitory effect of citreoviridin at a high concentration (20  $\mu\text{M}$ ) on the reverse activity of ATP synthase.

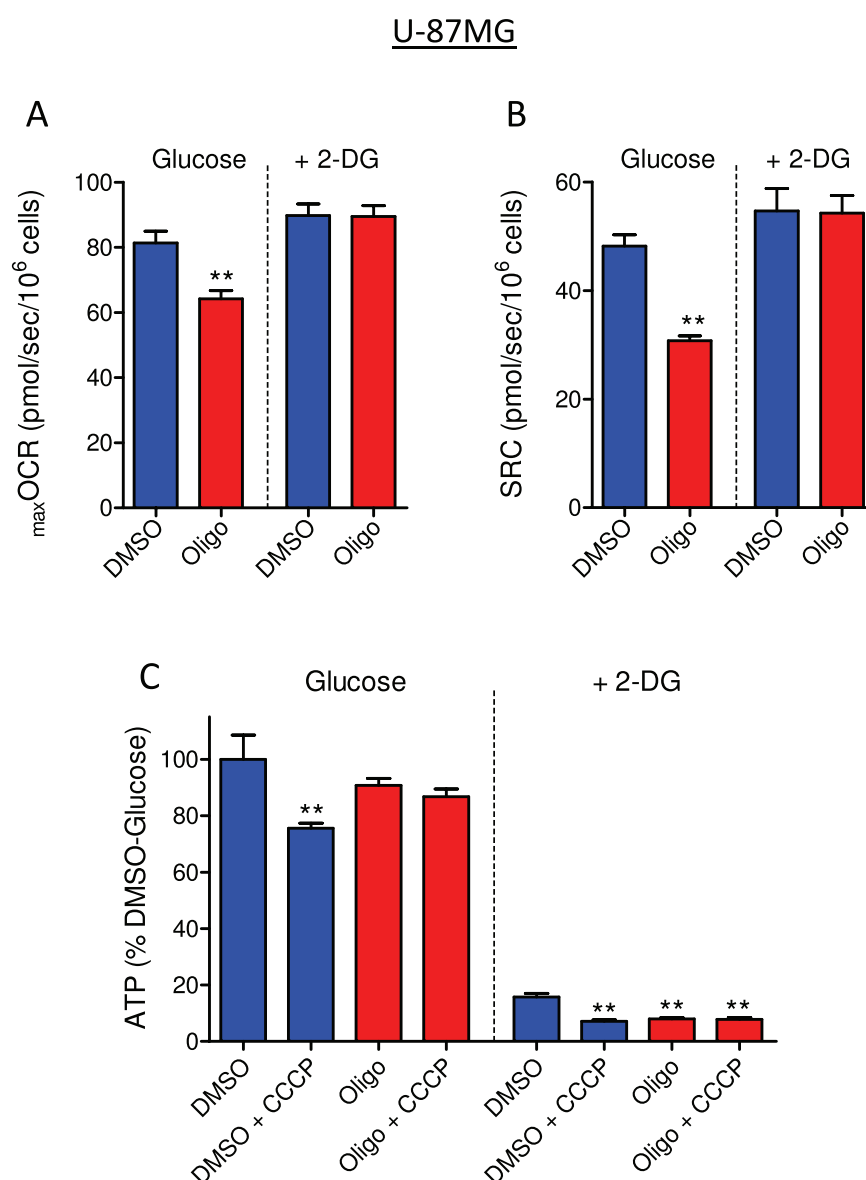


**Figure 7.** Effect of 2-deoxyglucose (2-DG) on oligomycin-induced underestimation of  $\text{max OCR}$  and on ATP levels in T98G glioma cells. T98G cells ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) were incubated in sDMEM containing 20 mM HEPES in the presence or absence of 40 mM 2-DG. **(A,B)** Effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max OCR}$  **(A)** and estimated SRC **(B)** for T98G cells. The experiments were conducted by adding DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ) or 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (Oligo) after a stable basal respiration rate was reached, followed by sequential additions of CCCP (2  $\mu\text{M}$  each). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ . **(C)** Measurements of ATP levels in T98G cells. Data were normalized as a percentage of the values of ATP in DMSO in the absence of 2-DG (% DMSO-Glucose). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ .

**ATP, but not ADP, inhibits  $\text{max OCR}$  in digitonin-permeabilized T98G and U-87MG glioma cells.** To investigate the direct influence of ATP on  $\text{max OCR}$ , digitonin-permeabilized cells were incubated in the presence of ADP or ATP (i.e., ADP plus phosphocreatine and creatine phosphokinase, an ATP regeneration system) (Fig. 11). Permeabilized cells were used to allow easy adjustment of extramitochondrial ADP and ATP levels and to assess their effects on CCCP-induced  $\text{max OCR}$ . The presence of only ADP did not inhibit  $\text{max OCR}$  in either cell line; however, the presence of ATP inhibited  $\text{max OCR}$  by  $26.0 \pm 2.7\%$  in T98G cells and  $19.3 \pm 1.8\%$  in U-87MG cells.

**Effects of oligomycin and CCCP on mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and OCR in human glioma cell lines.** To further assess the underestimation of  $\text{max OCR}$  and SRC that occurs in the presence of oligomycin, OCR and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) were determined in parallel in intact T98G and U-87MG cells (Figs 12 and 13). A stable fluorescence signal of TMRM (500 nM) in sDMEM was obtained after approximately 8 min (not shown), after which cells were added. Oligomycin (or its vehicle DMSO)





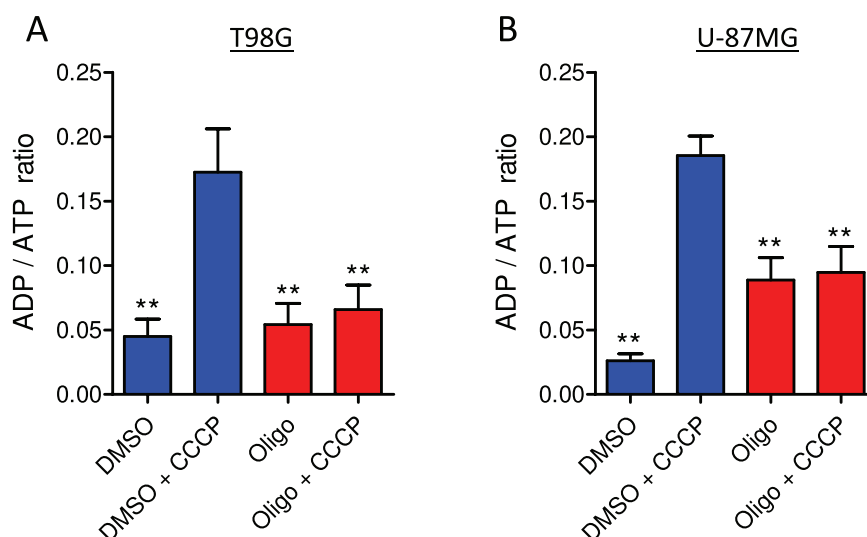
**Figure 8.** Effect of 2-DG on oligomycin-induced underestimation of  $\text{maxOCR}$  and on ATP levels in U-87MG glioma cells. The experiments were conducted with U-87MG cells ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) under the same conditions described in Fig. 7 for T98G cells. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \*\* $P < 0.01$ .

was then added to inhibit the activity of ATP synthase, and titration of the protonophore CCCP was carried out to progressively decrease  $\Delta\Psi_m$  and achieve  $\text{maxOCR}$ .

In DMSO without oligomycin,  $\text{maxOCR}$  was reached with 12  $\mu\text{M}$  and 9  $\mu\text{M}$  CCCP for T98G and U-87MG cells, respectively (Figs 12A and 13A), whereas in the presence of oligomycin, lower CCCP concentrations (6  $\mu\text{M}$  and 3  $\mu\text{M}$ ) were required (Figs 12B and 13B). However, higher protonophore concentrations were required to completely dissipate  $\Delta\Psi_m$  in both cell lines: 15  $\mu\text{M}$  in the absence of oligomycin and 9  $\mu\text{M}$  in its presence. These results show that protonophore-induced  $\text{maxOCR}$  occurred at a low  $\Delta\Psi_m$ , but complete dissipation of  $\Delta\Psi_m$  led to inhibition of OCR (Figs 12C and 13C). This finding is in accordance with the inhibition of mitochondrial transport of substrates that can occur when  $\Delta\Psi_m$  is dissipated<sup>10,25–27</sup>. Figures 12D and 13D show that  $\text{maxOCR}$  was significantly underestimated in both cell lines when oligomycin was present and that  $\text{maxOCR}$  was observed under higher  $\Delta\Psi_m$  in the presence of oligomycin than in its absence (DMSO condition).

## Discussion

The results presented here indicate that the underestimation of CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  in tumor cell lines treated with oligomycin is caused by the high glycolytic activity of these cells. This conclusion is supported by the elimination of the inhibitory effect of oligomycin on  $\text{maxOCR}$  when the glycolytic pathway was minimized using either glutamine as the only respiratory oxidative substrate (Figs 5 and 6) or the glycolytic inhibitor 2-DG (Figs 7 and 8).



**Figure 9.** Determination of ADP/ATP ratio in T98G and U-87MG glioma cells. Cells were incubated in sDMEM containing 20 mM HEPES with and without oligomycin (in DMSO) and with and without CCCP as indicated. Statistically significant difference in relation to the condition “DMSO + CCCP”, \*\* $P < 0.01$ .

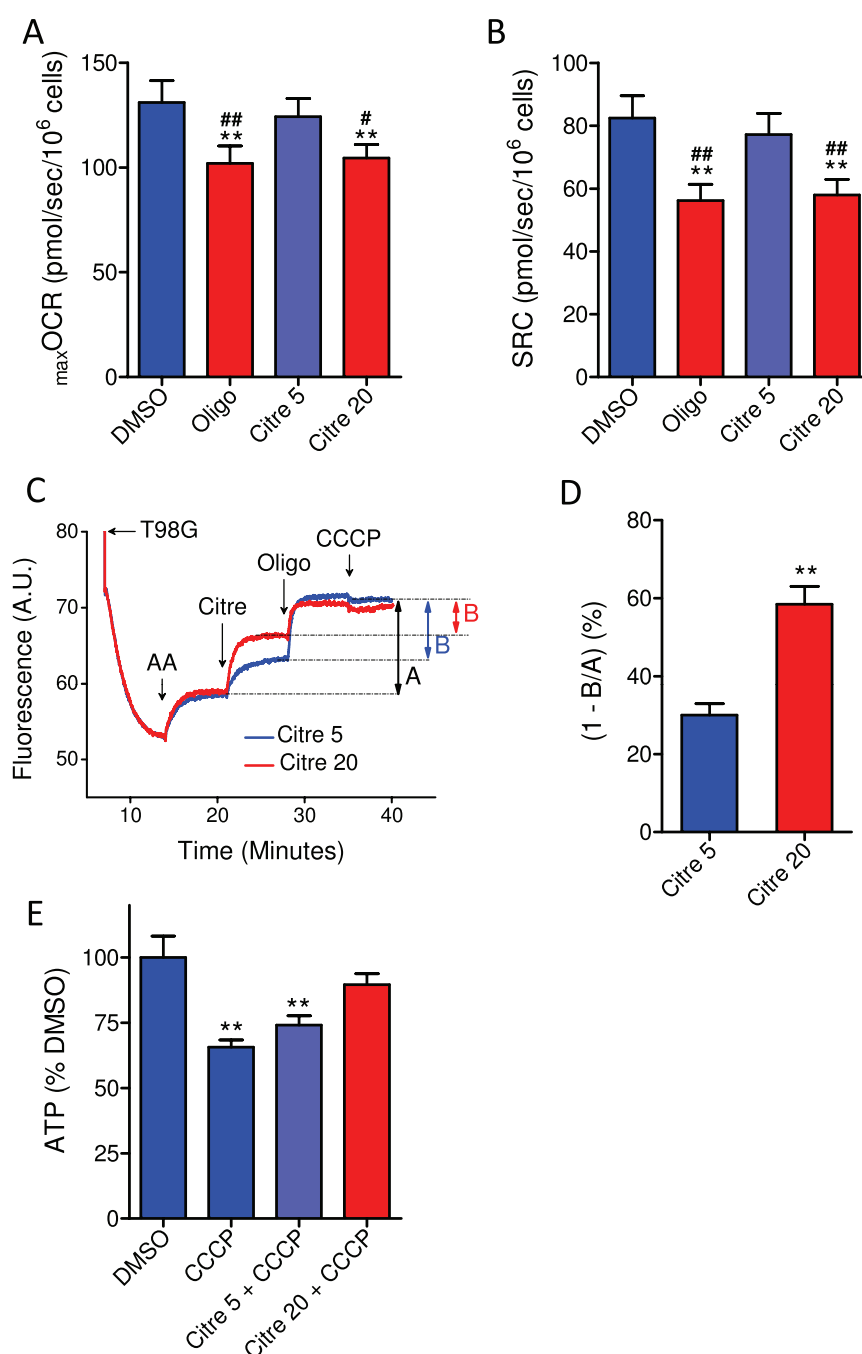
Furthermore, parallel determinations of OCR and  $\Delta\Psi_m$  showed that  $\max$ OCR was observed in the presence of a low  $\Delta\Psi_m$  (Figs 12 and 13), which was higher when the estimation was performed in the presence of oligomycin (Figs 12D and 13D). This result indicates that  $\max$ OCR cannot be reached in the presence of oligomycin because of limiting factors, as will be discussed later.

Measurements of cellular ATP levels and ADP/ATP ratios showed an association between the maintenance of intracellular ATP levels by glycolysis and the inhibitory effect of oligomycin on CCCP-induced  $\max$ OCR (Figs 7–9). When glycolysis was limited, either by using glutamine as the only metabolic substrate or by the presence of 2-DG, cellular ATP levels were not sustained. Under these conditions, a similar  $\max$ OCR was obtained in both the presence and absence of oligomycin (Figs 5–8). In the absence of this ATP synthase inhibitor, the decrease in glycolytic ATP in the presence of CCCP was mostly due to ATP consumption by the reverse activity of mitochondrial ATP synthase (Figs 5E, 7C and 8C). Even though slow reverse operation of ATP synthase is expected in respiration-impaired mitochondria with an intact inner membrane<sup>28</sup>, higher reverse activity occurs under conditions of strong uncoupling, e.g., in CCCP-induced  $\max$ OCR or when the integrity of the inner mitochondrial membrane is disrupted.

The results of the experiments conducted with the ATP synthase inhibitor citreoviridin, a compound that affects the forward and reverse activity of ATP synthase differently<sup>23,24</sup> (Fig. 10C,D), further support the proposition that cellular ATP levels are reduced by the reverse activity of ATP synthase under uncoupling conditions. A low concentration of citreoviridin (5  $\mu$ M), which almost completely inhibited the forward activity of ATP synthase<sup>14</sup> but had only a minor effect on the reverse activity (Fig. 10D), neither prevented a decrease in ATP levels by CCCP nor inhibited CCCP-induced  $\max$ OCR. However, at a higher concentration (20  $\mu$ M), citreoviridin inhibited the reverse activity of ATP synthase to a greater degree, preventing the drop in ATP caused by CCCP and resulting in the inhibition of CCCP-induced  $\max$ OCR.

Exposing digitonin-permeabilized cells to exogenous ATP but not ADP resulted in partial inhibition of CCCP-induced  $\max$ OCR (Fig. 11). Maintenance of a higher intracellular ATP/ADP ratio may limit CCCP-induced  $\max$ OCR by inhibiting enzymes involved in the reduction of  $\text{NAD}^+$  to NADH in the mitochondrial matrix, thereby restricting electron transfer from carbon substrates to ETS. According to previous studies, a higher ATP/ADP ratio in the mitochondrial matrix is associated with lower activity of pyruvate dehydrogenase (PDH), isocitrate dehydrogenase-3 (IDH-3) and glutamate dehydrogenase (GDH). ADP stimulates PDH activity by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase, which phosphorylates and inactivates PDH<sup>29,30</sup>; a decrease in ATP/ADP ratio results in lower IDH-3  $K_m$  values for its substrates<sup>31,32</sup>, and GDH is subject to positive allosteric regulation by ADP<sup>33,34</sup>. Interestingly, a recent study with astrocytes revealed that ADP-stimulated GDH plays an important role under conditions of increased mitochondrial oxidative metabolism demand<sup>35</sup>. This pathway may play an important role in the supply of mitochondrial NADH to glutamine-addicted highly glycolytic tumor cells<sup>19,36</sup>. In addition, a high intramitochondrial ATP/ADP ratio may also limit  $\max$ OCR by promoting partial inhibition of NADH oxidation. Kadenbach's group<sup>37</sup> demonstrated that the binding of ADP and ATP to cytochrome *c* oxidase (respiratory complex IV) regulates the activity of this enzyme. Allosteric inhibition of cytochrome *c* oxidase by ATP occurs in the presence of a high intramitochondrial ATP/ADP ratio and may inhibit  $\max$ OCR even in the presence of sufficient NADH<sup>37,38</sup>.

In the present study, ATP contents and ADP/ATP ratios were determined in total cell extracts. Because of the negative-inside mitochondrial membrane potential, the ADP/ATP ratio is significantly different between the cytosol and the mitochondrial matrix<sup>39</sup>. However, our main inferences are based on experimental conditions in which membrane potential is mostly dissipated (i.e., in the presence of CCCP or CCCP plus oligomycin). Under such conditions an equilibrium between the cytosol and mitochondrial matrix ADP/ATP ratios is expected<sup>39</sup>.



**Figure 10.** Effect of citreoviridin on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  and ATP levels in T98G glioma cells: correlation with its inhibitory effect on the reverse activity of ATP synthase. T98G cells ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were incubated in sDMEM containing 20 mM HEPES for OCR measurements, and the same medium without phenol red was used to estimate mitochondrial membrane potential. **(A,B)** Effect of 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  **(A)** and estimated SRC **(B)** in T98G cells. The experiments were conducted by adding DMSO (0.5  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin (Oligo), 5  $\mu\text{M}$  citreoviridin or 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin after a stable basal respiration rate was reached, followed by sequential additions of CCCP (2  $\mu\text{M}$  each) to obtain  $\text{maxOCR}$ . Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $^{**}P < 0.01$ . Statistically significant difference in relation to treatment with 5  $\mu\text{M}$  citreoviridin (citre 5),  $^{\#}P < 0.05$  and  $^{##}P < 0.01$ . **(C)** Representative traces of the citreoviridin effect on mitochondrial membrane potential sustained by the reverse activity of ATP synthase. Cells were incubated in sDMEM without phenol red and with 500 nM TMRM and 1  $\mu\text{M}$  TPB<sup>-</sup>. Where indicated by the arrow, 1  $\mu\text{M}$  antimycin (AA) was added, followed by addition of 5  $\mu\text{M}$  or 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin (Citre). Next, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin was added to completely inhibit the reverse activity of ATP synthase, followed by addition of 5  $\mu\text{M}$  CCCP. The fraction of mitochondrial membrane potential that is maintained by the reverse activity of ATP synthase is indicated by the letter “A”, while the fraction that is insensitive to citreoviridin is indicated by the letter “B”. **(D)** Estimation of the membrane potential fractions that are maintained by the reverse activity of ATP synthase and are sensitive to 5  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$  citreoviridin ( $1 - B/A$ ). Statistically

significant difference in relation to 5  $\mu$ M citreoviridin (Citre 5),  $**P < 0.01$ . (E) Effect of CCCP on ATP levels of T98G cells incubated with 5  $\mu$ M or 20  $\mu$ M citreoviridin. Data were normalized as a percentage of the values of ATP in DMSO (% DMSO). Statistically significant difference in relation to the control (DMSO),  $**P < 0.01$ .

Significant inhibition of protonophore-induced  $\text{max}$ OCR was also observed by Kim *et al.*<sup>40</sup> in an oligomycin-treated INS-1E pancreatic beta cell line. This effect was associated with time-dependent exposure to oligomycin that was likely causing a progressive loss of cell function in the absence of oxidative phosphorylation<sup>40</sup>. However, our results with glioma cell lines seem to differ in nature from those observed in INS-1E cells because the limitation on  $\text{max}$ OCR was observed very soon after addition of oligomycin to cells sustaining high intracellular ATP levels. Given that many studies have evaluated mitochondrial oxidative metabolism in highly proliferative tumor cell lines (i.e., highly glycolytic cells), the mechanism of oligomycin-mediated underestimation of  $\text{max}$ OCR reported here is likely to be more widespread in experimental protocols.

We conclude that high glycolytic activity leads to the underestimation of CCCP-induced  $\text{max}$ OCR and SRC in tumor cells treated with oligomycin. Under these conditions, oligomycin maintains cellular ATP levels by preventing the reverse activity of ATP synthase. Minimizing glycolytic activity may allow more accurate assessment of  $\text{max}$ OCR in the presence of ATP synthase inhibitors.

## Methods

**Chemicals.** Adenosine diphosphate (ADP; catalog number: A2754), carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone (CCCP; cat. C2759), creatine phosphokinase from rabbit muscle (CK; cat. C3755), 2-deoxy-D-glucose (2-DG; cat. D8375), digitonin (cat. D141), dimethylsulfoxide (DMSO; cat. D8418), L-glutamic acid (cat. G1251), L-glutamine (cat. G3126), L-malic acid (cat. M1000), nucleoside 5'-diphosphate kinase from *S. cerevisiae* (NDK; cat. N0379), oligomycin (oligo; cat. O4876), phosphocreatine disodium salt (PCr; cat. P7936), pyruvic acid sodium salt (cat. P4562) and sodium tetraphenylboron (TPB<sup>-</sup>; cat. T4125) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The oligomycin compound is a mixture of three oligomycins (A, B and C, where oligomycin A represents approximately 65% of the mixture). Deoxycytidine triphosphate (dCTP) solution (cat. 10217-016) and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM; cat. T668) were supplied by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and citreoviridin (citre; cat. 11319) by Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

CCCP, citreoviridin, oligomycin and TMRM stock solutions were prepared in DMSO; CK, 2-DG, glutamate, glutamine, HEPES, malate, NDK, PCr, pyruvate and TPB<sup>-</sup> stock solutions were prepared in deionized water; ADP and HEPES solutions were adjusted to pH 7.2 with NaOH; and glutamate, malate and pyruvate solutions were adjusted to pH 7.2 with KOH.

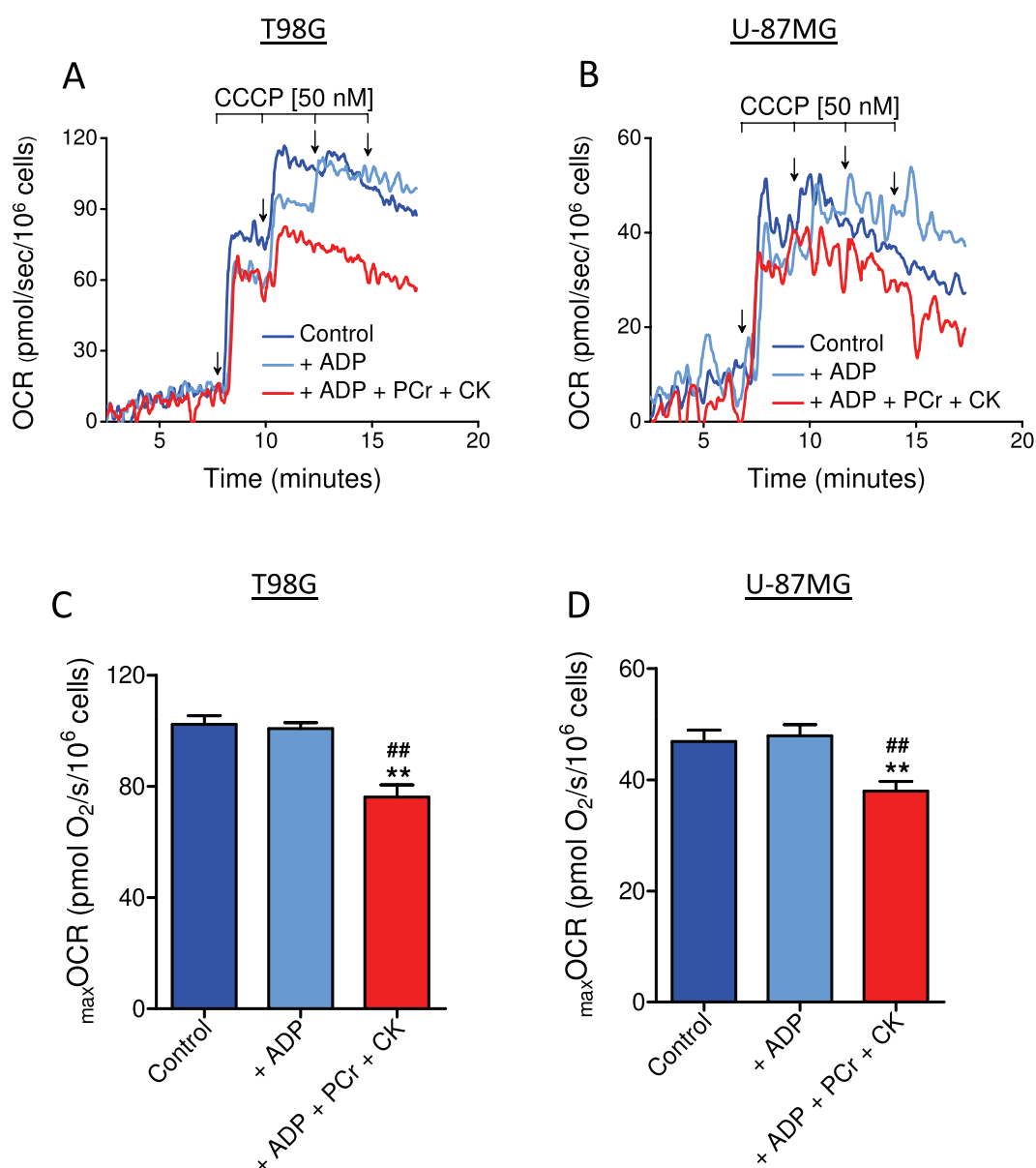
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), with or without 5.5 or 11 mM glucose, 1.25 mM pyruvate, 4 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate and 15 mg/L phenol red, were all supplied by Vitrocell (Campinas, São Paulo, Brazil). Antibiotics ( $1 \times 10^4$  U/mL penicillin plus 10 mg/mL streptomycin) and fetal bovine serum (FBS) were also supplied by Vitrocell. Unless otherwise specified, DMEM contained 11 mM glucose, 4 mM glutamine, 1.25 mM pyruvate, 44 mM sodium bicarbonate and 15 mg/L phenol red. The concentrations of the energy substrates are within the ranges normally used in cultures and cell metabolic analysis<sup>12,13</sup>.

**Cell Lines and Cell Culture.** The human glioblastoma T98G and U-87MG cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured as previously described<sup>14</sup>. On the day of the experiment, the cells were trypsinized and resuspended ( $16\text{--}32 \times 10^6$  cells/mL;  $>95\%$  viability) in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (sDMEM) containing 20 mM HEPES. For experiments testing the components of the medium (glucose 5.5 mM or 11 mM, glutamine, sodium bicarbonate and FBS), cells were resuspended in the corresponding experimental medium as described in the figure legends. Cell suspensions were maintained at room temperature (ca. 23 °C) and used within 2.5 h.

The data reported here are from experiments conducted over 18 months; as the cells were expanded from different frozen aliquots, and the components of the medium (e.g., FBS) were from different batches, absolute mean values of some variables can be expected to vary (e.g.,  $\text{max}$ OCR can oscillate up to 25%) more than the standard error of the mean when experiments performed a couple of months apart are compared. Nonetheless, we would emphasize that each experimental protocol was conducted within 2 to 4 weeks and that these variations were not observed; moreover, the effects of treatments were consistent throughout the whole study.

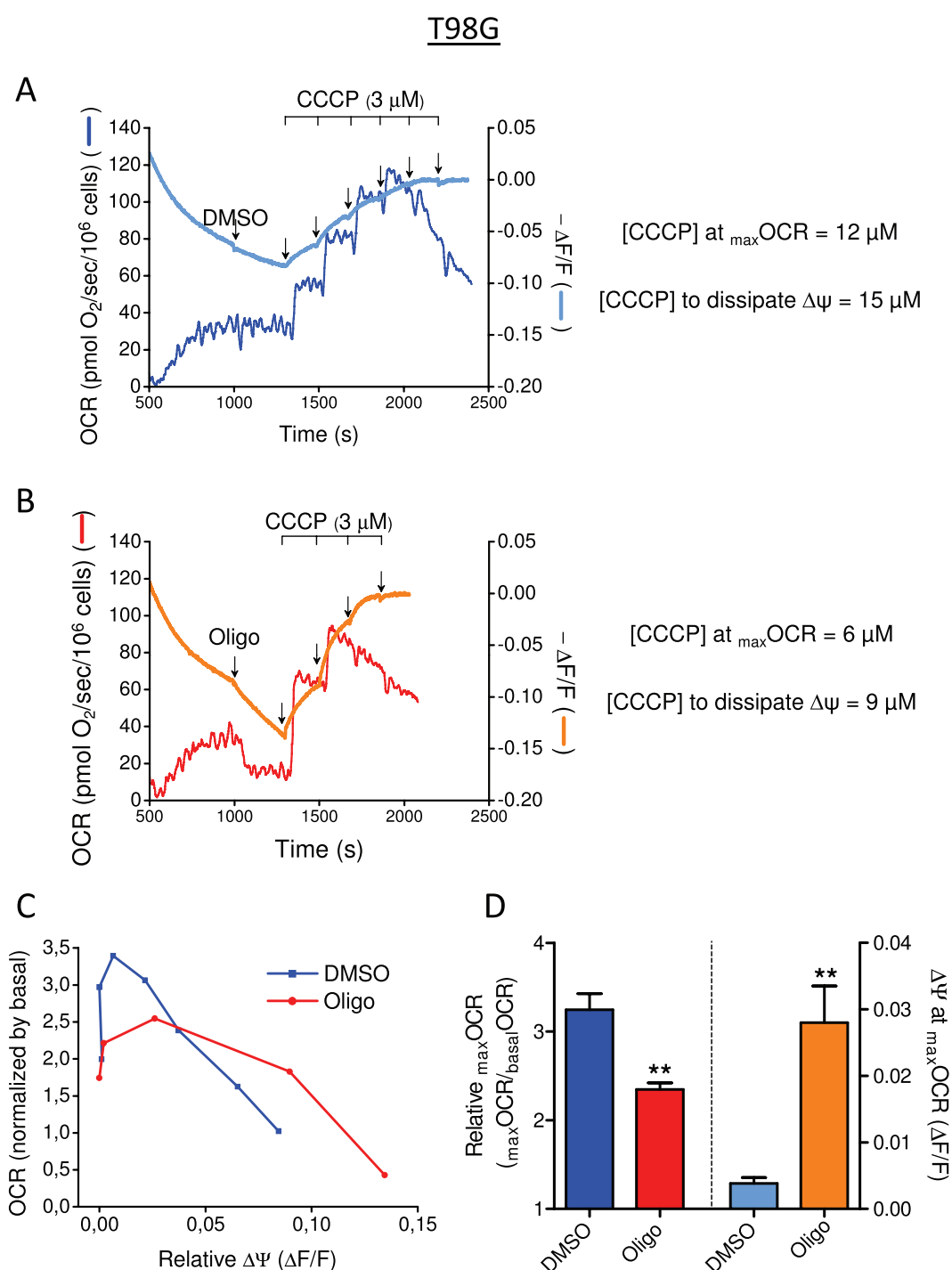
**Measurement of OCR in suspended tumor cells.** The OCR in intact and permeabilized suspended cells was determined using a respirometer (OROBOROS Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria), as previously described<sup>14,19</sup>. In intact tumor cells this was carried out by incubating an aliquot of the cell suspension ( $2\text{--}4 \times 10^6$  cells) at 37 °C in a 2 mL chamber containing the reaction medium, as described in the figure legends. OCR was measured in permeabilized cells by incubating  $3\text{--}4 \times 10^6$  cells at 37 °C in 2 mL of "permeabilization medium" containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1  $\mu$ g/mL oligomycin, 10 mM HEPES-K<sup>+</sup> pH 7.2 and respiratory substrates (1 mM glutamate, 0.5 mM malate and 1 mM pyruvate), as well as digitonin (30  $\mu$ M) for plasma membrane permeabilization. The concentrations of the respiratory substrates in the "permeabilization medium" were chosen to better resemble those found *in situ* (submillimolar levels), enabling the inhibitory effect of adenine nucleotides on the oxidative metabolism of these substrates to be studied.

**Measurement of ATP content and ADP/ATP ratio in suspended tumor cells.** T98G cells ( $1.5 \times 10^6$ /mL) and U-87MG cells ( $2 \times 10^6$ /mL) were resuspended in DMEM or sDMEM containing 20 mM HEPES. DMSO or oligomycin (1  $\mu$ g/mL) was added to the cell suspension samples and incubated for 4–5 min, and CCCP (1  $\mu$ M

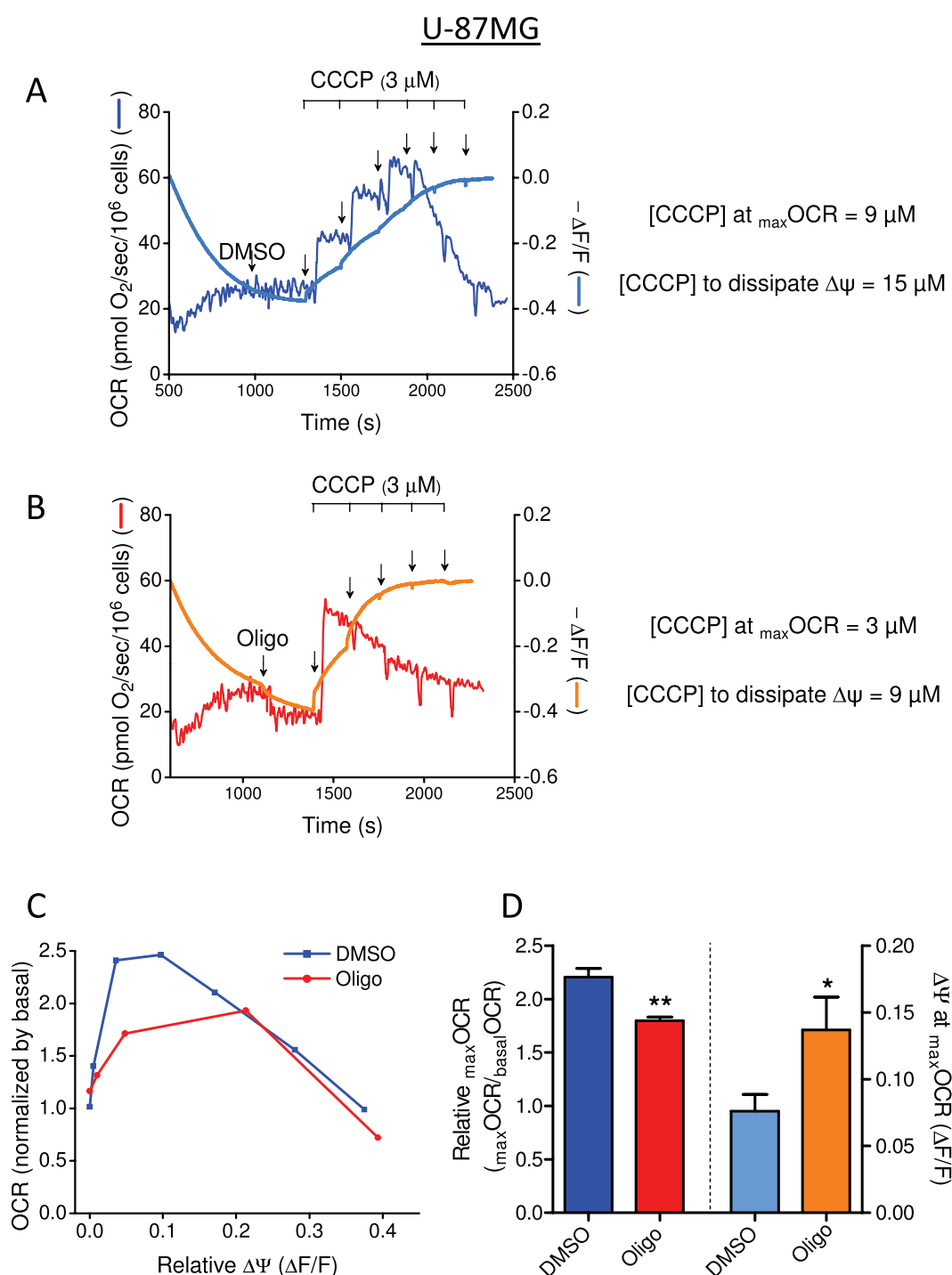


**Figure 11.** Effect of ADP and ATP on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  in permeabilized T98G and U-87MG cells. T98G ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) and U-87MG ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) cells were incubated in “permeabilization medium” containing  $30 \mu\text{M}$  digitonin, and  $\text{maxOCR}$  was estimated by sequential additions of CCCP ( $0.05 \mu\text{M}$  each). The effects of ADP and ATP on  $\text{maxOCR}$  were assessed by incubating the cells in the presence of  $1 \text{ mM}$  ADP or an ATP regeneration system ( $1 \text{ mM}$  ADP,  $10 \text{ mM}$  phosphocreatine plus  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  creatine phosphokinase). (**A,B**) Representative traces of OCR in permeabilized T98G and U87-MG cells. (**C,D**) Effects of ADP and ATP on CCCP-induced  $\text{maxOCR}$  in permeabilized T98G and U87-MG cells. Statistically significant difference versus the corresponding control,  $**P < 0.01$ . Statistically significant difference in relation to “+ ADP”,  $^{##}P < 0.01$ .

for DMEM or  $10 \mu\text{M}$  for sDMEM) was then added to some of the samples and incubated for an additional 10–12 min. Cell suspensions were immediately centrifuged ( $6,000 \text{ g}$ , 5 min), the supernatants were discarded, and the pellets were homogenized in  $1 \text{ mL}$  of lysis buffer ( $25 \text{ mM}$  TRIS-phosphate,  $\text{pH } 7.8$ ,  $2 \text{ mM}$  dithiothreitol,  $2 \text{ mM}$  EDTA,  $10\%$  glycerol and  $1\%$  Triton X-100) compatible with the luciferase assay reagents and maintained for 5 min in an ice bath. Control experiments showed that the centrifugation step did not significantly impair cell viability (results not shown). Samples were then analyzed for ATP content using a luminescence assay (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, G7570) in a plate reader (SpectraMax M3 – Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Luminescence was read at  $560 \text{ nm}$  in endpoint mode with an integration time of 1 sec. SoftMax Pro 6.4 software was used for data acquisition. To estimate ADP content,  $100 \mu\text{M}$  dCTP and  $10 \text{ U}/\text{mL}$  NDK were added and luminescence was read again after 10 min<sup>41</sup>.



**Figure 12.** Monitoring mitochondrial OCR and membrane potential in T98G human glioma cells: effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max OCR}$ . T98G cells ( $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were resuspended in sDMEM without phenol red containing 20 mM HEPES, 500 nM TMRM and 1 μM TPB<sup>-</sup>. (**A,B**) Representative traces of mitochondrial OCR and membrane potential in suspended T98G cells. Where indicated by arrows, DMSO (0.5 μL) or 1 μg/mL oligomycin (Oligo) was added, followed by sequential additions of CCCP (3 μM each). OCR is shown on the left ordinate axis, and the mitochondrial membrane potential on the right axis. Membrane potential is expressed as  $-\Delta F/F$ , where F is the fluorescence intensity after the last addition of CCCP and  $\Delta F$  is F minus any given fluorescence intensity. (**C**) Graphical correlation of mitochondrial OCR and membrane potential. OCR values were normalized by the respective basal OCR. (**D**) The left ordinate axis shows the relative  $\text{max OCR}$  ( $\text{max OCR}/\text{basal OCR}$ ) for T98G cells in the presence and absence of oligomycin. The right ordinate axis shows the mitochondrial membrane potential (ΔF/F) when  $\text{max OCR}$  was achieved. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 13.** Monitoring mitochondrial OCR and membrane potential in U-87MG human glioma cells: effect of oligomycin on CCCP-induced  $\text{max OCR}$ . The experiments were conducted with U-87MG cells ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) using the same conditions described in Fig. 12 for T98G cells. Statistically significant difference in relation to the control (DMSO), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

**Mitochondrial membrane potential measurements in suspended intact tumor cells.** The mitochondrial membrane potential in suspended intact cells was evaluated with the fluorescent probe TMRM on a Hitachi F7000 spectrofluorometer (Tokyo, Japan) equipped with magnetic stirring and operating with excitation and emission wavelengths of 553 and 576 nm, respectively, and a response time of 2 sec. Slit width was 2.5 nm for excitation and 5.0 nm for emission. Cell suspensions were trypsinized and resuspended in phenol red-free sDMEM containing 20 mM HEPES, and  $2-4 \times 10^6/2$  mL cells were added to sDMEM containing 20 mM HEPES, 500 nM TMRM and 1  $\mu$ M TPB, which was present to facilitate TMRM equilibrium across the plasma membrane<sup>42</sup>.



Simultaneous measurements of OCR were taken in the chamber of the OROBOROS respirometer under identical experimental conditions.

Membrane potential, expressed as  $\Delta F/F$ , was calculated, where F is the fluorescence intensity after the last addition of CCCP (i.e., completely dissipated  $\Delta\Psi_m$ ) and  $\Delta F$  is F minus any given fluorescence intensity<sup>43</sup>.

**Statistical analysis.** The results are shown as representative traces and/or the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Experiments were performed with cells from at least four different passages. Paired Student's t-test was applied to analyze differences between two groups. Multiple comparisons were performed by repeated-measures one-way analysis of variance (ANOVA) and the *post hoc* Bonferroni test<sup>44</sup>.

## Data Availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## References

- Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* **345**, 1250256, <https://doi.org/10.1126/science.1250256> (2014).
- Kasahara, A. & Scorrano, L. Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **24**, 761–770, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.005> (2014).
- Birsoy, K. *et al.* An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell* **162**, 540–551, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016> (2015).
- Crabtree, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* **23**, 536–545 (1929).
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M. & Devin, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 568–576, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.08.010> (2011).
- Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 325–337, <https://doi.org/10.1038/nrc3038> (2011).
- Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 685–698, <https://doi.org/10.1038/nrc3365> (2012).
- Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 9–15, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712> (2015).
- Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297–312, <https://doi.org/10.1042/BJ20110162> (2011).
- Pesta, D. & Gnaiger, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol.* **810**, 25–58, [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3) (2012).
- Connolly, N. M. C. *et al.* Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* **25**, 542–572, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0020-4> (2018).
- Nicholls, D. G. *et al.* Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J. Vis. Exp.* **46**, e2511, <https://doi.org/10.3791/2511> (2010).
- Ruas, J. S. *et al.* Underestimation of the maximal capacity of the mitochondrial electron transport system in oligomycin-treated cells. *PLoS One* **11**, e0150967, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150967> (2016).
- Hao, W., Chang, C. P., Tsao, C. C. & Xu, J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J. Biol. Chem.* **285**, 12647–12654, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084194> (2010).
- Stafstrom, C. E., Roopra, A. & Sutula, T. P. Seizure suppression via glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose (2DG). *Epilepsia* **49**(Suppl 8), 97–100, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01848.x> (2008).
- Kalia, V. K., Prabhakara, S. & Narayanan, V. Modulation of cellular radiation responses by 2-deoxy-D-glucose and other glycolytic inhibitors: implications for cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* **5**(Suppl 1), S57–60, <https://doi.org/10.4103/0973-1482.55145> (2009).
- Zhong, D. *et al.* 2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 809–817, <https://doi.org/10.1158/1535-7163> (2008).
- Rodrigues-Silva, E. *et al.* Evaluation of mitochondrial respiratory function in highly glycolytic glioma cells reveals low ADP phosphorylation in relation to oxidative capacity. *J. Neurooncol.* **133**, 519–529, <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2482-0> (2017).
- Rego, A. C., Vesce, S. & Nicholls, D. G. The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome c in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ.* **8**, 995–1003, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400916> (2001).
- Huber, H. J., Dussmann, H., Kilbride, S. M., Rehm, M. & Prehn, J. H. Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 470, <https://doi.org/10.1038/msb.2011.2> (2011).
- Ibsen, K. H., Coe, E. L. & McKee, R. W. Interrelationships of metabolic pathways in the Ehrlich ascites carcinoma cells. I. Glycolysis and respiration (Crabtree effect). *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 384–400 (1958).
- Linnett, P. E., Mitchell, A. D., Osselton, M. D., Mulheirn, L. J. & Beechey, R. B. Citreoviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* **170**, 503–510 (1978).
- Sayood, S. F., Suh, H., Wilcox, C. S. & Schuster, S. M. Effect of citreoviridin and isocitreoviridin on beef heart mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 714–721 (1989).
- LaNoue, K. F. & Tischler, M. E. Electrogenic characteristics of the mitochondrial glutamate–aspartate antiporter. *J. Biol. Chem.* **249**, 7522–7528 (1974).
- Zhdanov, A. V., Waters, A. H., Golubeva, A. V., Dmitriev, R. I. & Papkovsky, D. B. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 51–62, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.008> (2014).
- Chowdhury, S. R., Djordjevic, J., Albensi, B. C. & Fernyhough, P. Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci. Rep.* **36**, e00286, <https://doi.org/10.1042/BSR20150244> (2015).
- Chinopoulos, C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett.* **585**, 1255–1259, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.004> (2011).
- Chiang, P. K. & Sacktor, B. Control of pyruvate dehydrogenase activity in intact cardiac mitochondria. Regulation of the inactivation and activation of the dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **250**, 3399–3408 (1975).
- Patel, M. S. & Roche, T. E. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* **4**, 3224–3233 (1990).
- Gabriel, J. L., Zervos, P. R. & Plaut, G. W. Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism* **35**, 661–667 (1986).
- Qi, F., Chen, X. & Beard, D. A. Detailed kinetics and regulation of mammalian NAD-linked isocitrate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1641–1651, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.07.001> (2008).



33. Frieden, C. Glutamate dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. *J. Biol. Chem.* **240**, 2028–2035 (1965).
34. Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A. & Smith, T. J. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 69–80, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.015> (2012).
35. Nissen, J. D. *et al.* Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. *Glia* **65**, 474–488, <https://doi.org/10.1002/glia.23105> (2017).
36. Wise, D. R. & Thompson, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 427–433, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003> (2010).
37. Arnold, S. & Kadenbach, B. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* **249**, 350–354, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00350.x> (1997).
38. Ramzan, R., Staniek, K., Kadenbach, B. & Vogt, S. Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1672–1680, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.005> (2010).
39. Heldt, H. W., Klingenberg, M. & Milovancev, M. Differences between the ATP-ADP ratios in the mitochondrial matrix and in the extramitochondrial space. *Eur. J. Biochem.* **30**, 434–440 (1972).
40. Kim, C. *et al.* Comparative analysis of the mitochondrial physiology of pancreatic  $\beta$  cells. *Bioenergetics* **3**, 110, <https://doi.org/10.4172/2167-7662.1000110> (2014).
41. Jansson, V. & Jansson, K. An enzymatic cycling assay for adenosine 5'-monophosphate using adenylate kinase, nucleoside-diphosphate kinase, and firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **321**, 263–265 (2003).
42. Gerencser, A. A. *et al.* Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* **590**, 2845–2871, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.228387> (2012).
43. Figueira, T. R., Melo, D. R., Vercesi, A. E. & Castilho, R. F. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol* **810**, 103–117, [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_7) (2012).

## Acknowledgements

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant numbers 11/50400-0 and 17/17728-8) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant numbers 308228/2014-6 and 401131/2016-5). JSR is the recipient of a CAPES fellowship. ER-S is the recipient of a CNPq fellowship.

## Author Contributions

J.S.R. planned and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. E.S.S.S. performed the experiments and provided technical support. E.R.S. performed the experiments. R.F.C. provided financial support, planned the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

### 3.3. Capítulo III – Resultados Complementares

No intuito de estabelecer um protocolo que permitisse a utilização do inibidor da ATP sintase oligomicina em células intactas sem que ocorresse o efeito de subestimação do  $OCR_{max}$ , e consequentemente do SRC, foi proposto o uso do inibidor glicolítico 2-deoxi-glicose (2-DG). Dessa forma, uma adição de 40 mM de 2-DG foi realizada após a adição de oligomicina, mas precedendo a titulação do CCCP para obtenção do  $OCR_{max}$ .

O experimento foi conduzido medindo-se o consumo de oxigênio por células em suspensão em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). As linhagens celulares T98G (**Fig. 6**), A549 (**Fig. 7**) e C2C12 (**Fig. 8**) foram incubadas em meio DMEM contendo 11 mM de glicose, 4 mM de glutamina e 1,25 mM de piruvato como substratos respiratórios.

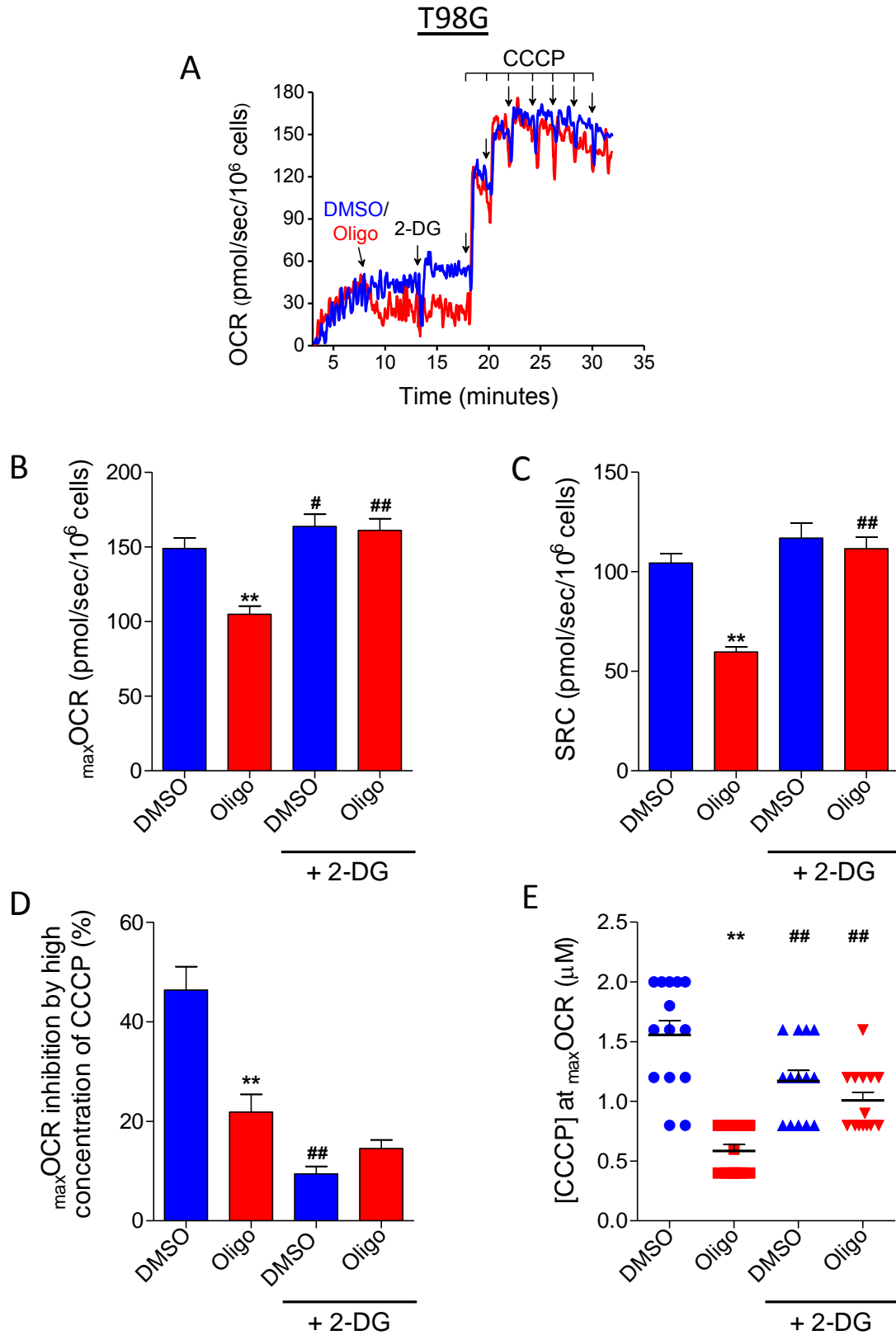
A respiração (OCR) basal foi determinada após oito minutos de incubação das células em meio DMEM. Em seguida foi adicionado DMSO ou 1  $\mu$ g/mL de oligomicina, permitindo-se a determinação da fração do OCR basal relacionada à síntese de ATP. Após cinco minutos subsequentes (13º minuto), adicionou-se 40 mM de 2-DG e depois de mais cinco minutos (18º minuto) procedeu-se à titulação do protonóforo CCCP, com adições sequenciais de 400 nM, conforme apresentado na figura representativa **6A**. A última adição de CCCP correspondeu a 800 nM, com o intuito de atingir uma concentração final deste protonóforo que correspondesse ao dobro da concentração ótima para se obter o  $OCR_{max}$ , permitindo desta forma a avaliação do efeito do excesso de CCCP na inibição da  $OCR_{max}$  (**Figs. 6D, 7C e 8C**).

Como é possível se observar, o 2-DG preveniu completamente o efeito da oligomicina na subestimação do  $OCR_{max}$ , bem como do SRC, nas linhagens celulares T98G (**Fig. 6A-C**) e C2C12 (**Fig. 8A, B**). Enquanto nas células A549 (**Fig. 7A, B**), a presença de oligomicina resultou em uma tendência de inibição do  $OCR_{max}$  (e do SRC) não significativa estatisticamente mesmo na presença de 2-DG.

É de se notar que, na presença de 2-DG, a inibição do  $OCR_{max}$  por excesso do protonóforo CCCP (dobro da concentração ótima para se obter o  $OCR_{max}$ ) foi 79,7% menor na condição DMSO e 57,4% menor na presença de oligomicina na linhagem celular T98G (**Fig. 6D**). Da mesma maneira, com a linhagem celular A549, essa inibição do  $OCR_{max}$  pelo excesso de CCCP na presença

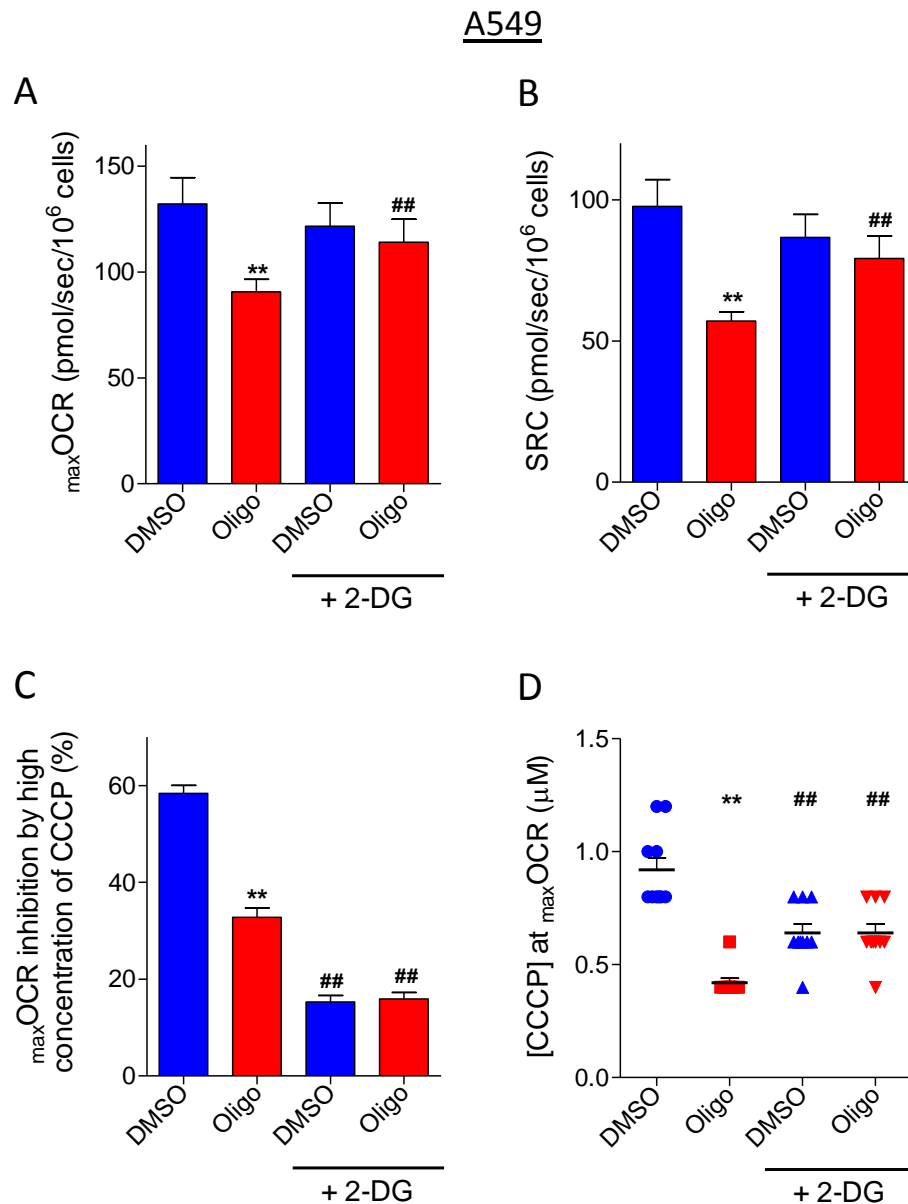
de 2-DG foi 73,8% menor na condição DMSO e 51,5% menor na presença de oligomicina (**Fig. 7C**). Já com a linhagem C2C12, essa inibição por excesso de CCCP do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  foi 73,7% e 43,8% menor na presença de DMSO e oligomicina, respectivamente (**Fig. 8C**). Desta forma, ressalta-se que a utilização de 2-DG também foi favorável por diminuir drasticamente a inibição no  $\text{OCR}_{\text{max}}$  causada por excesso de CCCP, permitindo o uso deste protonóforo numa faixa maior de concentração, sem que este afete de maneira significativa o  $\text{OCR}_{\text{max}}$ .

Durante a realização destes experimentos, a concentração de CCCP necessária para se atingir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  variou. Apesar desta variação, na ausência de 2-DG, a concentração de CCCP para se obter o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  de uma célula foi praticamente a metade na presença de oligomicina quando comparada à condição controle (DMSO). Em contrapartida, quando o 2-DG esteve presente, concentrações semelhantes do protonóforo foram necessárias para se atingir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  na condição controle e oligomicina (**Figs. 6E, 7D e 8D**). A concentração de CCCP necessária para se atingir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  em cada condição reflete indiretamente a velocidade de transferência de  $\text{H}^+$  da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Esta transferência de  $\text{H}^+$  ocorre por dois processos durante a determinação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$ : pelos complexos respiratórios durante a transferência de elétrons do NADH e  $\text{FADH}_2$  até o  $\text{O}_2$  e pela atividade reversa da ATP sintase, com hidrólise de ATP a ADP, observada em potenciais de membrana mais baixos. Na condição controle (DMSO) ambos os processos de transferência de  $\text{H}^+$  da matriz para o espaço intermembranas estão presentes. No entanto, a atividade reversa da ATP sintase é inibida pela presença de oligomicina e indiretamente afetada na presença de 2-DG, por uma menor disponibilidade de ATP glicolítico.

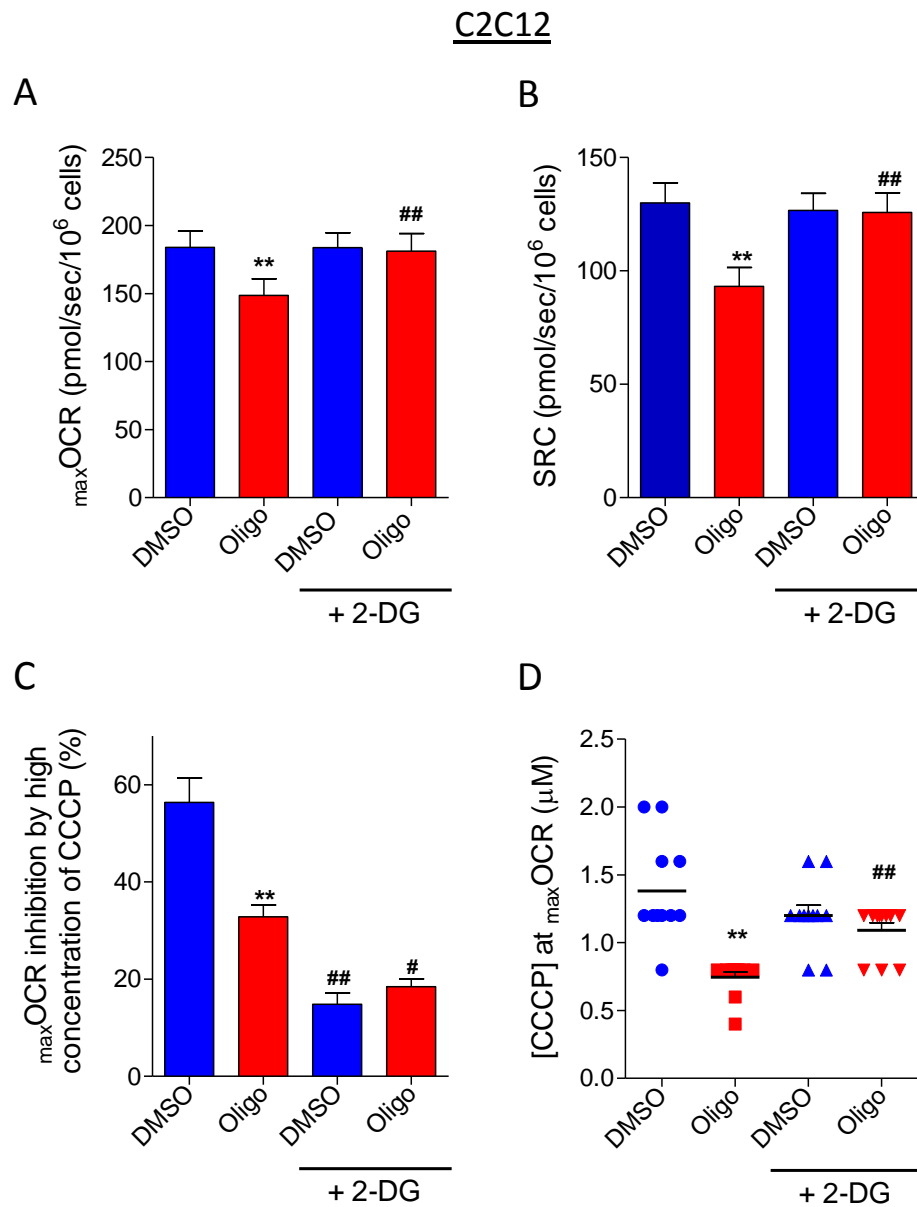


**Figura 6:** Protocolo que viabiliza o uso do inibidor da ATP sintase oligomicina sem que ocorra o efeito de subestimação do OCR<sub>max</sub> e do SRC, utilizando-se o inibidor glicolítico 2-deoxi-glicose (2-DG). Células T98G (1 x 10<sup>6</sup>/mL) foram incubadas em meio DMEM contendo 11 mM de glicose, 4 mM de glutamina, 1,25 mM de piruvato e 20 mM de HEPES (pH 7,2). O DMEM não continha vermelho de fenol e bicarbonato de sódio. **A:** Figura representativa do consumo de oxigênio por células T98G em suspensão. Onde indicado pelas setas, 1 μg/mL de oligomicina ou DMSO (0,5 μL, correspondendo ao volume adicionado de oligomicina) foram adicionados, seguido pela adição de 40 mM de 2-DG e então pela titulação de CCCP (400 nM cada adição, sendo a última de 800 nM). **B e C:** Efeito da adição de 2-DG após DMSO ou oligomicina na determinação do OCR<sub>max</sub> (**B**) e SRC (**C**). **D:**

Porcentagem da inibição do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  pelas células T98G observada quando se utilizou o dobro da concentração ótima de CCCP. **E:** Concentrações de CCCP necessárias para se atingir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  em linhagem de células T98G. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (DMSO),  $**P<0,01$ . Diferença estatisticamente significativa em relação à condição correspondente sem 2-DG,  $^{\#}P<0,05$  e  $^{\#\#}P<0,01$ .



**Figura 7:** Protocolo que viabiliza o uso do inibidor da ATP sintase oligomicina sem que ocorra o efeito de subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e do SRC, utilizando-se o inibidor glicolítico 2-deoxi-glicose (2-DG). Células A549 ( $1,25 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram incubadas em meio DMEM contendo 11 mM de glicose, 4 mM de glutamina, 1,25 mM de piruvato e 20 mM de HEPES (pH 7,2). O DMEM não continha vermelho de fenol e bicarbonato de sódio. **A e B:** Efeito da adição de 2-DG após DMSO ou oligomicina na determinação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  (**A**) e SRC (**B**). **C:** Porcentagem da inibição do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  pelas células A549 observada quando se utilizou o dobro da concentração ótima de CCCP. **D:** Concentrações de CCCP necessárias para se atingir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  em linhagem de células A549. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (DMSO),  $**P<0,01$ . Diferença estatisticamente significativa em relação à condição correspondente sem 2-DG,  $^{\#\#}P<0,01$ .



**Figura 8:** Protocolo que viabiliza o uso do inibidor da ATP sintase oligomicina sem que ocorra o efeito de subestimação do OCR<sub>max</sub> e do SRC, utilizando-se o inibidor glicolítico 2-deoxi-glicose (2-DG). Células C2C12 (1 x 10<sup>6</sup>/mL) foram incubadas sob as mesmas condições descritas na **Figura 7** para células A549. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (DMSO), \*\*P<0,01. Diferença estatisticamente significativa em relação à condição correspondente sem 2-DG, #P<0,05 e ##P<0,01.

## 4. DISCUSSÃO / CONCLUSÕES

A discussão desta Tese será apresentada em tópicos, de acordo com as principais conclusões decorrentes dos Resultados apresentados nos três capítulos (**Capítulos I, II e III**).

### 4.1. A inibição da ATP sintase em células intactas resulta em subestimação da capacidade máxima do sistema transportador de elétrons estimada com o uso de protonóforos.

No presente estudo, inicialmente se verificou que o inibidor da ATP sintase oligomicina influenciava a obtenção do  $OCR_{max}$ , e consequentemente do SRC, em linhagens de células tumorais intactas. Como o  $OCR_{max}$  é obtido a partir do estímulo da respiração resultante da dissipação do potencial de membrana por protonóforos, teoricamente pressupõe-se que este parâmetro não é influenciado pela inibição da ATP sintase.

O efeito inibitório da oligomicina no  $OCR_{max}$  e SRC foi observado primeiramente em suspensões de linhagens de células de glioblastoma humano T98G e U-87MG (**Fig. 1 - Capítulo I**). Da mesma forma, este efeito foi reproduzido em linhagens de células derivadas de tumor de próstata (PC3; **Fig. Suplementar 1 - Capítulo I**), de câncer de pulmão (A549; **Fig. 7 - Capítulo III**) e de mioblastos (C2C12, **Fig. 8 - Capítulo III**). Notadamente, a subestimação do  $OCR_{max}$  e SRC na presença de oligomicina também foi observada em células T98G aderidas em placas (**Fig. 3 - Capítulo I**). A partir deste resultado, pode-se concluir que o efeito inibitório da oligomicina na obtenção do  $OCR_{max}$  não decorre do estresse que as células possam ter sofrido na etapa de sua remoção das placas de cultura por tripsinização ou por estarem em suspensão.

A oligomicina é um macrolídeo produzido por algumas espécies de *Streptomyces* (45, 46) e inibe a ATP sintase ligando-se na porção  $F_o$  deste complexo proteico, mais especificamente na subunidade OSCP (*oligomycin sensitivity-conferring protein*) (46-48). O composto utilizado na maior parte dos experimentos desta Tese foi adquirido da Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EUA) e é constituído de uma mistura das oligomicinas A, B e C, sendo que a forma A representa 65% do total. Neste contexto, testou-se se o efeito inibitório da

oligomicina na estimativa do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC poderia estar relacionado a algum contaminante presente neste composto. Para isso, testou-se uma oligomicina obtida de outro fornecedor (Cayman Chemical) e a forma A da oligomicina, que apresenta grande potência em inibir a ATP sintase (45). Observou-se que o efeito inibitório no  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC em células T98G é semelhante na presença da oligomicina comercializada pela Cayman ou de oligomicina A (**Fig. 4 – Capítulo I**). Este resultado sugere que o efeito da oligomicina não se deve a contaminantes ou outros componentes presentes no lote do composto utilizado na maior parte dos experimentos.

Tampouco o efeito inibitório da oligomicina no  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC se mostrou dependente da presença de concentrações excessivas deste composto. Esta conclusão é suportada pela observação que o uso de 0,3  $\mu\text{M}$  de oligomicina, uma concentração próxima da mínima necessária (**Fig. 2C – Capítulo I**; ref. 38) para se obter a inibição completa da ATP sintase, já resultou em inibição semelhante do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC que a observada na presença de uma concentração dez vezes maior de oligomicina (**Fig. 1A-D – Capítulo II**). O efeito inibitório da oligomicina no  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC também não se mostrou dependente de constituintes do meio de experimentação, como o bicarbonato de sódio (**Fig. 2 – Capítulo II**), soro fetal bovino (**Fig. 3 – Capítulo II**) ou de concentrações de glicose (5,5 e 11 mM; **Fig. 1E – Capítulo II**) e piruvato (1,25 e 10 mM; **Fig. 8 – Capítulo I**). Estes resultados são importantes porque mostram que o efeito da oligomicina descrito em nosso trabalho está presente numa ampla gama de condições experimentais.

Foi testado em células T98G intactas o efeito de citreoviridina, um inibidor da ATP sintase que interage com a subunidade  $\beta$  da porção  $F_1$  deste complexo (46, 49, 50). Foi utilizado 20  $\mu\text{M}$  deste inibidor, uma vez que esta concentração foi capaz de inibir completamente a fosforilação oxidativa em comparação a baixas concentrações (5  $\mu\text{M}$ ), quando ainda restava uma pequena fração da fosforilação oxidativa a ser inibida. Observou-se que a presença de 20  $\mu\text{M}$  de citreoviridina resultou em subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e do SRC (**Fig 5 – Capítulo I**), de maneira similar à observada com oligomicina. Este resultado indica que a subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  e SRC por oligomicina não se restringe a um efeito inespecífico deste composto, mas sim à inibição do complexo ATP sintase.



Observou-se também que a adição de oligomicina apresentou um efeito inibitório sobre o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  de células T98G já estimuladas pelo CCCP (**Fig. 2 – Capítulo I**). Corroborando a conclusão que o efeito da oligomicina está associado à inibição da ATP sintase, a concentração mínima (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) de oligomicina necessária para inibir o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  nesta condição foi a mesma capaz de inibir o consumo de oxigênio devido à fosforilação oxidativa em uma condição basal.

Por fim, determinações paralelas da medida do consumo de oxigênio e do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) mostraram que o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  foi observado a  $\Delta\Psi_m$  baixos em células T98G e U-87MG (**Figs. 12 e 13**, respectivamente – **Capítulo II**). É de se observar que o  $\Delta\Psi_m$  se apresentava maior na presença de oligomicina quando as células atingiam seu  $\text{OCR}_{\text{max}}$  (**Figs. 12D e 13D – Capítulo II**), sugerindo a presença de limitações para o desenvolvimento do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  nesta condição. Além disso, quando o  $\Delta\Psi_m$  foi dissipado por concentrações altas do protonóforo CCCP, houve uma rápida inibição da respiração mitocondrial, isso está de acordo com a dependência de potencial de membrana para a ocorrência do transporte de alguns substratos respiratórios através da membrana mitocondrial (1, 41-43).

O conjunto de resultados discutido acima descreveu pela primeira vez, de forma sistemática, que a presença de inibidores da ATP sintase leva a subestimação da capacidade máxima do sistema transportador de elétrons estimada com o uso de protonóforos. Parte destes resultados compõe um artigo publicado na *PLoS ONE* (51). Esta publicação recebeu destaque recentemente em um artigo de diretrizes sobre avaliação mitocondrial em células neuronais, que recomendou que o  $\text{OCR}_{\text{max}}$  seja preferencialmente avaliado na ausência de oligomicina (4).

A significativa inibição por oligomicina do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  induzido por protonóforos também foi observada por Kim e colaboradores (40) em linhagens de células  $\beta$ -pancreáticas, INS-1E, quando estas foram tratadas com oligomicina. Este efeito foi relacionado a longos períodos (> 60 min) de exposição à oligomicina, o que provavelmente teria levado a uma perda progressiva da função celular pela ausência da fosforilação oxidativa (40). Entretanto, nossos resultados com linhagens de células tumorais parecem diferir em natureza daqueles observados em células INS-1E, isso porque a subestimação do  $\text{OCR}_{\text{max}}$  foi observada logo após a adição de oligomicina em células que mantêm altos níveis de ATP intracelular nesta condição. Dado que muitos estudos avaliam o metabolismo oxidativo mitocondrial em

linhagens de células tumorais e proliferativas, ou seja, células altamente dependentes do metabolismo glicolítico, o mecanismo de subestimação do  $OCR_{max}$  mediado por oligomicina descrito nesta Tese é provavelmente mais difundido nos protocolos experimentais.

**4.2. A subestimação do  $OCR_{max}$  na presença de inibidores da ATP sintase está associada a uma alta atividade glicolítica de células tumorais. Inibidores da ATP sintase mantêm os níveis de ATP intracelular altos por prevenir a atividade reversa da ATP sintase mitocondrial.**

O estudo do  $OCR_{max}$  em células T98G e U-87MG com a membrana plasmática permeabilizada por digitonina não mostrou alterações significativas neste parâmetro na presença de oligomicina (**Fig. 9 – Capítulo I**). Uma vez que as células têm a membrana plasmática permeabilizada, há perda de componentes e funções citosólicas (52). Desta forma, em células permeabilizadas por digitonina é possível avaliar a função de mitocôndrias como se estas organelas estivessem isoladas. Este resultado sugeriu uma correlação entre a presença de vias citosólicas funcionais, como a glicólise, e o efeito de subestimação do  $OCR_{max}$  na presença de inibidores da ATP sintase.

As medidas dos níveis de ATP intracelular em células T98G e U-87MG e da razão ADP/ATP mostraram uma associação entre a manutenção dos níveis de ATP intracelular pela via glicolítica e o efeito inibitório da oligomicina sobre o  $OCR_{max}$  induzido por CCCP (**Figs. 7-9 – Capítulo II**). Observou-se que a presença de oligomicina isoladamente não resultou em diminuição dos níveis de ATP, indicando uma alta capacidade da via glicolítica em manter os níveis de ATP intracelular. Notadamente, na presença de CCCP, mas não de CCCP mais oligomicina, observou-se uma redução dos níveis de ATP. Estes resultados sugeriram que, na presença de CCCP, a inibição por oligomicina da atividade reversa da ATP sintase (hidrólise de ATP a ADP) estava envolvida com a manutenção dos níveis intracelulares de ATP. Na presença de CCCP, com a dissipação progressiva do  $\Delta\Psi_m$ , as mitocôndrias perdem a capacidade de síntese de ATP e passam a consumir ATP pela atividade reversa da ATP sintase na tentativa de reestabelecer o  $\Delta\Psi_m$  (53, 54). Embora uma atividade reversa lenta da ATP sintase seja esperada em mitocôndrias com a membrana interna intacta em condições de anóxia (55), uma

maior atividade reversa da ATP sintase ocorre sob condições de forte desacoplamento, por exemplo, quando se determina o  $OCR_{max}$  induzido por CCCP ou quando há perda da integridade da membrana mitocondrial interna.

Quando a atividade glicolítica foi abolida ou minimizada, utilizando-se glutamina como única fonte de substrato respiratório ou pela presença do inibidor glicolítico 2-DG, os níveis de ATP intracelular foram comprometidos, apresentando queda mesmo nas condições controle. Sob essas condições, de atividade glicolítica inibida, um  $OCR_{max}$  semelhante foi obtido tanto na presença quanto na ausência de oligomicina (**Figs. 5-8 – Capítulo II**).

Os resultados dos experimentos realizados com citreoviridina apoiam ainda a proposição de que os níveis de ATP intracelular são reduzidos pela atividade reversa da ATP sintase sob condições de desacoplamento (**Fig. 10C-D – Capítulo II**). A citreoviridina pode afetar de formas diferentes a atividade do complexo ATP sintase, podendo ter influência tanto na atividade de síntese, como também na atividade reversa (49, 56). Uma concentração baixa de citreoviridina (5  $\mu$ M) inibe quase completamente a atividade de síntese da ATP sintase (49), tendo apenas um efeito inibitório parcial na atividade reversa (**Fig. 10D – Capítulo II**; ref. 49). A concentração de 5  $\mu$ M de citreoviridina não preveniu a diminuição nos níveis de ATP por CCCP, nem inibiu o  $OCR_{max}$  induzido por CCCP. No entanto, uma concentração mais alta (20  $\mu$ M) de citreoviridina, que inibe tanto a atividade de síntese como a atividade reversa da ATP sintase, evitou a queda no ATP causada pelo CCCP, resultando na inibição da  $OCR_{max}$  induzida por CCCP.

Para a comprovação da associação entre a manutenção dos níveis de ATP intracelular e a subestimação do  $OCR_{max}$ , células T98G e U-87MG permeabilizadas com digitonina foram expostas a ATP exógeno, obtido a partir de um sistema regenerador de ATP composto de fosfocreatina, ADP e creatina quinase. Nesta condição, houve a subestimação do  $OCR_{max}$ , o que não ocorreu quando as células estavam expostas a somente ADP (**Fig. 11 – Capítulo II**).

Este conjunto de resultados indicou que a inibição do  $OCR_{max}$  na presença de oligomicina está associada à manutenção de altos níveis de ATP intracelular. A oligomicina, por inibir a atividade reversa da ATP sintase, mantém altos níveis de ATP intracelular mesmo quando a respiração mitocondrial é

desacoplada por CCCP. Nesta condição, o ATP é proveniente da alta atividade glicolítica característica de células tumorais e altamente proliferativas.

#### **4.3. O ATP pode inibir o $OCR_{max}$ por promover uma modulação alostérica negativa de enzimas da glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória.**

Quando o  $\Delta\Psi_m$  é bastante reduzido ou dissipado, a ATP sintase passa a trabalhar de forma reversa, como ATPase, na tentativa de restabelecer o  $\Delta\Psi_m$ , consumindo dessa forma o ATP produzido pela glicólise. Quando inibidores da ATP sintase, como a oligomicina ou altas concentrações de citreoviridina, estão presentes tanto a atividade de fosforilação do ADP à ATP, como sua atividade de ATPase estão inibidas. A inibição desta última contribui para a manutenção da razão ATP/ADP intracelular.

Células com alta atividade glicolítica, como a maioria das células tumorais e as proliferativas não-tumorais (57-59), podem manter parcialmente a razão ATP/ADP intracelular, mesmo na presença de inibidores da cadeia respiratória ou protonóforos, desde que oligomicina esteja presente para prevenir o consumo de ATP através da atividade reversa da ATP sintase (38, 60, 61).

A manutenção de uma maior razão intracelular de ATP/ADP pode limitar o  $OCR_{max}$  induzido por CCCP por inibir parcialmente a glicólise e enzimas envolvidas na redução de  $NAD^+$  a NADH na matriz mitocondrial, restringindo assim a transferência de elétrons dos substratos de carbono para a cadeia transportadora de elétrons.

Segundo estudos prévios, uma maior razão ATP/ADP retarda a glicólise (62, 63, 64), que gera os substratos respiratórios gliceraldeído-3-fosfato e piruvato. Este efeito de uma alta razão ATP/ADP na glicólise está relacionado, sobretudo, à modulação alostérica negativa das enzimas fosfofrutoquinase-1 e piruvato quinase que catalisam, respectivamente, as reações de conversão de frutose 6-fostato em frutose 1,6-bifosfato e fosfoenolpiruvato à piruvato.

Em adição, uma alta razão ATP/ADP está associada à menor atividade das enzimas mitocondriais piruvato desidrogenase (PDH), isocitrato desidrogenase-3 (IDH-3) e glutamato desidrogenase (GDH) (65-67) que catalisam, respectivamente

as reações de conversão de piruvato a acetil-coenzima A, isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato, e glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato.

O ADP estimula a atividade da PDH por inibir a piruvato desidrogenase quinase, que fosforila e inativa a PDH (68, 69); uma diminuição na razão ATP/ADP resulta em valores mais baixos de  $K_m$  da IDH-3 para seus substratos, ou seja, a enzima apresenta maior afinidade a seus substratos nessa condição (66, 70); e a GDH está sujeita à regulação alostérica positiva por ADP (71, 72). Notadamente, um estudo recente com astrócitos revelou que o estímulo da GDH por ADP desempenha um papel importante sob condições de aumento da demanda de metabolismo oxidativo mitocondrial (73). De fato, esta enzima pode desempenhar um papel importante no fornecimento de NADH mitocondrial a células tumorais, que apresentam grande dependência de glutamina como substrato mitocondrial (39, 74).

Por fim, uma alta razão ATP/ADP na matriz mitocondrial também pode limitar o  $OCR_{max}$  por promover inibição parcial da oxidação de NADH. O grupo de Kadenbach (75) demonstrou que a ligação de ADP e ATP à citocromo c oxidase (complexo respiratório IV) regula a atividade dessa enzima. A inibição alostérica da citocromo c oxidase pelo ATP ocorre na presença de uma alta razão ATP/ADP na matriz mitocondrial e pode inibir o  $OCR_{max}$  mesmo na presença de NADH suficiente (75, 76).

#### **4.4. Protocolos que minimizam a atividade glicolítica, diminuindo os níveis de ATP intracelular, são uma alternativa para medidas mais precisas do $OCR_{max}$ e SRC na presença de inibidores da ATP sintase.**

Células tumorais e proliferativas apresentam um metabolismo altamente glicolítico, geralmente obtendo mais de 50% do ATP por esta via (38, 58). Nesta Tese, caracterizamos que na presença de inibidores da ATP sintase ocorre uma subestimação do  $OCR_{max}$  (e conseqüentemente do SRC) induzida pelo uso de protonóforos. Conforme discutido acima, mostrou-se que a manutenção dos níveis de ATP intracelular pela alta atividade da via glicolítica pode explicar a subestimação do  $OCR_{max}$  na presença de inibidores da ATP sintase. Como já discutido, ao se minimizar a atividade glicolítica destas células, medidas mais precisas do  $OCR_{max}$  e do SRC foram obtidas.

Desta forma, propusemos um protocolo experimental com o intuito de se obter todos os parâmetros bioenergéticos, que são geralmente estimados, através de um único traçado do consumo de oxigênio. Para isso, adicionou-se o inibidor glicolítico 2-DG poucos minutos após a adição de oligomicina, conforme mostrado para células T98G na **Fig. 6A (Capítulo III)**. A seguir, procedeu-se a titulação de CCCP para se obter o  $OCR_{max}$ . Observou-se que, com este protocolo experimental, foi possível a determinação fidedigna da respiração basal, fração da respiração acoplada a síntese de ATP, vazamento de prótons,  $OCR_{max}$ , SRC e respiração não mitocondrial em três linhagens de células testadas (**Figs. 6-8 - Capítulo III**).

Esse protocolo é viável também para análise de células aderidas através do equipamento automatizado *Seahorse XF*, que permite somente quatro adições sequenciais ao longo do traçado experimental. Neste caso, as adições sequenciais seriam de oligomicina, 2-DG, CCCP/FCCP e inibidores da cadeia respiratória.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011, v. 435, p. 297-312. doi: 10.1042/BJ20110162. Review. Erratum in: *Biochem J.* 2011, v. 437, p.575. PubMed PMID: 21726199.
2. Silva AM, Oliveira PJ. Evaluation of Respiration with Clark Type Electrode in Isolated Mitochondria and Permeabilized Animal Cells. In: Palmeira C., Moreno A. (eds) *Mitochondrial Bioenergetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2012, v. 810. Humana Press.
3. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid. Redox Signal.* 2013, v. 18, p. 2029-74. doi: 10.1089/ars.2012.4729. PubMed PMID: 23244576.
4. Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, Bazan NG, Bernardi P, Bolaños JP, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* 2018, v. 25, p. 542-72. doi: 10.1038/s41418-017-0020-4. PubMed PMID: 29229998.
5. Nelson DL, Cox MM. *Princípios Bioquímica – LEHNINGER*. 5ª edição. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda; 2012.
6. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010, v. 47, p. 53-67. doi: 10.1042/bse0470053. PubMed PMID: 20533900.
7. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 2010, v. 5, p. 297-348. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314. PubMed PMID: 20078222.

8. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.* 2013, v. 123, p. 3678-84. doi: 10.1172/JCI69600. PubMed PMID: 23999442.
9. Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, v. 1793, p. 200-11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.028. PubMed PMID: 18620006.
10. Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Salgueiro-Pagadigorria CL. O estudo o metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (eds) *Métodos de Laboratório em Bioquímica*. 1ª edição. Barueri, SP: Editora Manole Ltda; 2003.
11. Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 2013, v. 41, p. 1-16. doi: 10.1042/BST20110773. PubMed PMID: 23356252.
12. Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E. High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. In: Palmeira C., Moreno A. (eds) *Mitochondrial Bioenergetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, v. 810. Humana Press; 2012.
13. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 2000, v. 80, p. 315-360. PubMed PMID: 10617771.
14. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol.* 2012, v. 810, p. 25-58. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0\_3. PubMed PMID: 22057559.
15. Severinghaus JW, Astrup PB. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. *J Clin Monit.* 1986, v.2, p. 125-39. PubMed PMID: 3519875.



16. Davies PW, Brink F. Microelectrodes for Measuring Local Oxygen Tension in Animal Tissues. *Scientific Instruments*. 1942, v. 13, p. 524. doi.org/10.1063/1.1769961.
17. Clark LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.* 1953, v. 6, p. 189-93. PubMed PMID: 13096460.
18. Hinkle PC. Oxygen, proton and phosphate fluxes, and stoichiometries. In: Brown GC, Cooper CE. *Bioenergetics: a practical approach*. Oxford, New York: IRL Press; 1995.
19. Walker D. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. 2ª edição. Sheffield, Inglaterra: Oxygraphics Limited; 1990.
20. Telegdy-Kováts, L. Manometric Methods. [Acesso em: setembro, 2018]. Disponível em: "file:///C:/Users/c151802/Downloads/3727-Article%20Text%20PDF-7485-1-10-20130718%20(1).pdf". 1957.
21. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011, v. 11, p. 325-37. doi: 10.1038/nrc3038. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2011, v. 11, p. 618. PubMed PMID: 21508971.
22. Rigel. Medición del consumo de oxígeno. [Acessado em: novembro de 2018]. Disponível em: "http://biorigel.blogspot.com/2010/07/medicion-del-consumo-de-oxigeno.html".
23. Horan MP, Pichaud N, Ballard JW. Review: quantifying mitochondrial dysfunction in complex diseases of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012, v. 67, p. 1022-35. doi: 10.1093/gerona/glr263. PubMed PMID: 22459622.

24. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, v. 51, p. 1621-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005. PubMed PMID: 2187265 6.
25. Clerc P, Polster BM. Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons. *PLoS One.* 2012, v. 7: e34465. doi: 10.1371/journal.pone.0034465. PubMed PMID: 22496810.
26. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol.* 2014, v. 27, p. 1-16. doi: 10.1002/0471140856.tx2502s60. PubMed PMID: 24865646.
27. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetics function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, v. 292: p. C125-36. PubMed PMID: 16971499.
28. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. In: Murphy A.N., Chan D.C. (eds) *Methods Enzymology*, 2014, v. 547, p. 309-54. doi: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3. PubMed PMID: 25416364.
29. Ferrick DA, Neilson A, Beeson C. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov. Today.* 2008, v. 13, p. 268-74. doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.008. PubMed PMID: 18342804.
30. Sauerbeck A, Pandya J, Singh I, Bittman K, Readnower R, Bing G, Sullivan P. Analysis of regional brain mitochondrial bioenergetics and susceptibility to mitochondrial inhibition utilizing a microplate based system. *J. Neurosci. Methods.*

2011, v. 198, p. 36-43. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.03.007. PubMed PMID: 21402103.

31. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J. Biol. Chem.* 1955, v.217, p. 409-27. PubMed PMID: 13271404.

32. Amo T, Yadava N, Oh R, Nicholls DG, Brand MD. Experimental assessment of bioenergetic differences caused by the common European mitochondrial DNA haplogroups H and T. *Gene.* 2008, v. 411, p. 69-76. doi: 10.1016/j.gene.2008.01.007. PubMed PMID: 18280061.

33. Rogers GW, Brand MD, Petrosyan S, Ashok D, Elorza AA, Ferrick DA, Murphy AN. High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One.* 2011, v.6: e21746. doi: 10.1371/journal.pone.0021746. PubMed PMID: 21799747.

34. Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *J. Physiol.* 2011, v. 589, p. 4413-21. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212712. PubMed PMID: 21708903.

35. Villani G, Attardi G. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, v. 29, p. 202-10. PubMed PMID: 11035248.

36. Piper HM, Sezer O, Schleyer M, Schwartz P, Hütter JF, Spieckermann PG. Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985, v. 17, p. 885-96. PubMed PMID: 4046049.

37. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* 2008, v. 3, p. 965-76. doi: 10.1038/nprot.2008.61 PubMed PMID: 18536644.

38. Hao W, Chang CP, Tsao CC, Xu J. Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J. Biol. Chem.* 2010, v. 285, p. 12647-54. doi: 10.1074/jbc.M109.084194. PubMed PMID: 20110356.
39. Rodrigues-Silva E, Siqueira-Santos ES, Ruas JS, Ignarro RS, Figueira TR, Rogério F, Castilho RF. Evaluation of mitochondrial respiratory function in highly glycolytic glioma cells reveals low ADP phosphorylation in relation to oxidative capacity. *J. Neurooncol.* 2017, v. 133, p. 519-29. doi: 10.1007/s11060-017-2482-0. PubMed PMID: 28540666.
40. Kim C, Patel P, Gouvin LM, Brown ML, Khalil A, Henchey EM, et al. Comparative Analysis of the Mitochondrial Physiology of Pancreatic  $\beta$  Cells. *Bioenergetics.* 2014, v. 3, p.110. PubMed PMID: 25309834.
41. LaNoue KF, Tischler ME. Electrogenic characteristics of the mitochondrial glutamate–aspartate antiporter. *J. Biol. Chem.* 1974, v. 249, p. 7522–28. PubMed PMID: 4436323.
42. Zhdanov AV, Waters AH, Golubeva AV, Dmitriev RI, Papkovsky DB. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, v. 1837, p. 51-62. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.07.008. PubMed PMID: 23891695.
43. Chowdhury SR, Djordjevic J, Albensi BC, Fernyhough P. Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci. Rep.* 2015, v. 36: e00286. doi: 10.1042/BSR20150244. PubMed PMID: 26647379.
44. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature.* 1989, v. 339, p. 487-8. PubMed PMID: 2725683.
45. Lardy HA, Witonsky P, Johnson D. Antibiotics as tools for metabolic studies. IV. Comparative effectiveness of oligomycins A, B, C, and rutamycin as inhibitors of

phosphoryl transfer reactions in mitochondria. *Biochemistry*. 1965 v. 4, p. 552-4. PubMed PMID: 14311628.

46. Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008, v. 72, p. 590-641. doi: 10.1128/MMBR.00016-08. PubMed PMID: 19052322.

47. Devenish RJ, Prescott M, Boyle GM, Nagley P. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000, v. 32, p. 507-15. PubMed PMID: 15254386.

48. Symersky J, Osowski D, Walters DE, Mueller DM. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, v. 109, p. 13961-5. doi: 10.1073/pnas.1207912109. PubMed PMID: 22869738.

49. Linnett PE, Mitchell AD, Osselton MD, Mulheirn LJ, Beechey RB. Citreoviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 1978, v. 170, p. 503-10. PubMed PMID: 148274.

50. Gause EM, Buck MA, Douglas MG. Binding of citreoviridin to the beta subunit of the yeast F1-ATPase. *J Biol Chem.* 1981, v. 256, p. 557-9. PubMed PMID: 6450205.

51. Ruas JS, Siqueira-Santos ES, Amigo I, Rodrigues-Silva E, Kowaltowski AJ, Castilho RF. Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells. *PLoS One.* 2016, v.11:e0150967. doi: 10.1371/journal.pone.0150967. PubMed PMID: 26950698.

52. Fiskum G, Craig SW, Decker GL, Lehninger AL. The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980, v. 77, p. 3430-4. PubMed PMID: 6997878.

53. Rego AC, Vesce S, Nicholls DG. The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome c in apoptotic GT1-7 neural cells. *Cell Death Differ.* 2001, v. 8, p. 995-1003. PubMed PMID: 11598797.
54. Huber HJ, Dussmann H, Kilbride SM, Rehm M, Prehn JH. Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Mol. Syst. Biol.* 2011, v. 7, p. 470. doi: 10.1038/msb.2011.2. PubMed PMID:21364572.
55. Chinopoulos C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett.* 2011, v. 585, p. 1255-9. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.004. PubMed PMID: 21486564.
56. Sayood SF, Suh H, Wilcox CS, Schuster SM. Effect of citreoviridin and isocitreoviridin on beef heart mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, v. 270, p. 714-21. PubMed PMID: 2523213.
57. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008, v. 7, p. 11-20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002. PubMed PMID: 18177721.
58. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009, v. 324, p. 1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PubMed PMID: 19460998.
59. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012, v. 21, p. 297-308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014. PubMed PMID: 22439925.
60. Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 1998, v. 18, p. 10277-86. PubMed PMID: 9852565.

61. Ivanov F, Faccenda D, Gatliff J, Ahmed AA, Cocco S, Cheng CH, et al. The compound BTB06584 is an IF1 -dependent selective inhibitor of the mitochondrial F1 Fo-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 2014, v. 171, p. 4193-206. doi: 10.1111/bph.12638. PubMed PMID: 24641180.
62. Hers HG, Van Schaftingen E. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem.* 1982, v. 206, p. 1-12. PubMed PMID: 6289809.
63. Mor I, Cheung EC, Voudsen KH. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2011, v. 76, p. 211-6. doi: 10.1101/sqb.2011.76.010868. Epub 2011 Nov 17. Review. PubMed PMID: 22096029.
64. Maldonado EN, Lemasters JJ. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. *Mitochondrion.* 2014, Pt A, p. 78-84. doi: 10.1016/j.mito.2014.09.002. PubMed PMID: 25229666.
65. Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1980, v. 117, Suppl: K73-85. PubMed PMID: 6998729.
66. Gabriel JL, Zervos PR, Plaut GW. Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism.* 1986, v. 35, p. 661-667. PubMed PMID: 3724458.
67. Wiegand G, Remington SJ. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1986, v. 15, p. 97-117. PubMed PMID: 3013232.
68. Chiang PK, Sacktor B. Control of pyruvate dehydrogenase activity in intact cardiac mitochondria. Regulation of the inactivation and activation of the dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1975, v. 250, p. 3399-408. PubMed PMID: 123530.

69. Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 1990, v. 4, p. 3224-33. PubMed PMID: 2227213.
70. Qi F, Chen X, Beard DA. Detailed kinetics and regulation of mammalian NAD-linked isocitrate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, v. 1784, p. 1641-51. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.07.001. PubMed PMID: 18672100.
71. Frieden C. Glutamate dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. *J. Biol. Chem.* 1965, v. 240, p. 2028-35. PubMed PMID: 14299621.
72. Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, v. 519 p. 69-80. doi: 10.1016/j.abb.2011.10.015. PubMed PMID: 22079166.
73. Nissen JD, Lykke K, Bryk J, Stridh MH, Zaganas I, Skytt DM, et al. Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. *Glia.* 2017, v. 65, p. 474-88. doi: 10.1002/glia.23105. PubMed PMID: 28032919.
74. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 2010, v. 35, p. 427-33. doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.003. PubMed PMID: 20570523.
75. Arnold S, Kadenbach B. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 1997, v. 249, p. 350-4. PubMed PMID: 9363790.
76. Ramzan R, Staniek K, Kadenbach B, Vogt S. Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, v. 1797, p. 1672-80. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.06.005. PubMed PMID: 20599681.



## 6. ANEXOS

## Declaração

Em observância à resolução **CNS nº 466/12**, referente ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos, bem como à "**LEI AROUCA**" (LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal), estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**Avaliação da Capacidade Máxima da Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial em Linhagens de Células Tumorais**", desenvolvida pelo Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração "Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento" da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos ou animais, sendo utilizado para os experimentos linhagens de células imortalizadas comercializadas pelas empresas "Banco de Células do Rio de Janeiro" (Duque de Caxias, RJ), bem como pela "American Type Culture Collection - ATCC" (Manassas, VA, EUA).

Assinatura: Juliana Silveira Ruas

Nome da aluna: **Juliana Silveira Ruas**

Assinatura: Roger Frigério Castilho

Nome do orientador: **Prof. Dr. Roger Frigério Castilho**

**Prof. Dr. ROGER F. CASTILHO**  
Depto. de Patologia Clínica  
FCM/UNICAMP  
Matr. 27901-3

Data: 26/09/2018

**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MÁXIMA DA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS MITOCONDRIAL EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 26/11/2018

Assinatura : Juliana Silveira Ruas

Nome do(a) autor(a): **Juliana Silveira Ruas**

RG n.º 46.027.727-3

Assinatura : Roger Frigério Castilho

Nome do(a) orientador(a): **Roger Frigério Castilho**

RG n.º 21.372.147-8

Prof. Dr. ROGER F. CASTILHO  
Depto. de Patologia Clínica  
FCM/UNICAMP  
Matr. 27901-3